

MANUAL

“Alternativas de secado para la conservación de semillas”

Estudiante: Camila Saenz
Directora: Lorena Deladino
Tutor: Raúl M. Amado Cattáneo



Trabajo final
Prácticas Bioquímicas segundo semestre 2018

INTRODUCCION

Las variedades hortícolas de polinización abierta, son recursos genéticos, que en los últimos años, han ido ganando importancia para los mercados locales (ferias de venta directa del productor al consumidor, bolsones). En la actualidad, este tipo de semillas, son un insumo de importancia para la Agricultura Familiar del Cordón Hortícola de la ciudad de La Plata, debido a cuestiones de costos, en comparación a las semillas híbridas importadas, y al constituir el eslabón primario en sistemas productivos de transición agroecológicos.

Los bancos de semillas han sido propuestos como uno de los métodos más eficaces y económicos para el almacenamiento de recursos genéticos. Por un lado, las semillas son unidades adaptadas a la dispersión en el tiempo y, por lo tanto, en muchos casos son capaces de permanecer viables, de forma natural, durante largos períodos (Chin, 1994). En segundo lugar, el pequeño tamaño de las semillas, unido a la posibilidad de que cada una de ellas posea una constitución genética diferente, asegura la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriondo y Pérez, 1999). Por ello, el almacenamiento en forma de semillas es el preferido para conservar el 90% de las seis millones de accesiones mantenidas en colecciones ex situ en todo el mundo (Rao y col., 2007).

Las estrategias de conservación de los recursos dependen de la política de manejo de cada banco de germoplasma. En este sentido, la calidad de las semillas almacenadas en los bancos es muy variable y está relacionada con la eficacia de los métodos de secado y condiciones de almacenamiento de las mismas, por lo que es necesario determinar la mejor manera de almacenar las colecciones que se obtienen. Si bien se sabe que las condiciones de frío seco brindan una mayor longevidad en comparación con las condiciones de calor húmedo, ha habido cierto debate sobre el ambiente óptimo para el almacenamiento de semillas.

La determinación directa de las condiciones de almacenamiento óptimas para cada accesión en una colección de germoplasma está limitada por la disponibilidad de mano de obra y semillas, así como por la naturaleza a largo plazo de los experimentos requeridos (Vertucci y Roos, 1993). Este trabajo busca determinar las condiciones óptimas de secado por diferentes metodologías para el almacenamiento de las semillas en el proyecto de extensión Banco de Germoplasma: fortalecimiento de la Agricultura

Familiar (BdG), perteneciente al Programa de Extensión en Alimentos y Salud (PEAS) de la Universidad Nacional de La Plata. Debido a la falta de equipamiento específico, los experimentos fueron realizados en su mayoría en el laboratorio de nuevos alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

El objetivo principal de este trabajo es determinar las condiciones óptimas de tiempo y temperatura para el secado de las semillas de tomate Chadwick por tres métodos diferentes: Secado en estufa y secado en dos atmósferas diferentes en equilibrio con sales (LiCl y ZnCl_2) (Iglesias y Chirife, 1992). Se propone evaluar el nivel de calidad de las semillas luego de cada procesamiento y almacenamiento, mediante determinación del porcentaje de germinación, vigor y test de tetrazolio (Moore, 1962). A raíz de este trabajo surge la necesidad de redactar un manual de secado que incluya los protocolos utilizados en las diferentes determinaciones para que las mismas puedan ser reproducidas por los operarios del BdG, por lo que se decidió ordenar la información obtenida en este Manual de Secado: "Alternativas para la conservación de semillas en un BdG".

PARÁMETROS UTILIZADOS PARA DESCRIBIR EL SECADO DE SEMILLAS

Entre los parámetros a considerar para definir las condiciones óptimas de secado para el almacenamiento de las semillas, se evalúa el contenido de humedad de las mismas como un determinante importante de la longevidad (Vertucci y Roos, 1993). El nivel de humedad en las semillas puede ser descrito de varias maneras: contenido de humedad en gramos de agua por gramos de peso fresco o seco (%H₂O bh o %H₂O bs), actividad de agua (**aw**) y potencial químico del agua. En este trabajo se hará hincapié en las dos primeras.

El contenido de humedad es simplemente una medida de la concentración de agua en la semilla (Vertucci y Roos, 1993). Puede expresarse como la relación entre la masa de agua contenida en la semilla y la masa total de la semilla (**MH**), o entre la masa de agua contenida en la semilla y la masa de sólidos totales de la semilla (**ST**). Dependiendo de esto, dicha concentración queda expresada como porcentaje de agua en base húmeda (%H₂O (**bh**)) o en base seca (% H₂O (**bs**)) respectivamente:

$$\%H_2O(bh) = \frac{\text{masa } H_2O}{MH} = \frac{MH - ST}{MH} \quad (1)$$

$$\% H_2O (bs) = \frac{\text{masa } H_2O}{ST} = \frac{MH - ST}{ST} \quad (2)$$

Se sabe que existe una relación, aunque imperfecta, entre el contenido de agua de una semilla y su vida útil. Se ha observado que diferentes tipos de alimentos con el mismo contenido de agua difieren significativamente en su estabilidad o vida útil. En consecuencia el contenido de agua por sí solo no es un indicador real de la estabilidad. Esta situación se atribuye, en parte, a diferencias en la intensidad con que el agua se asocia con los constituyentes no acuosos; el agua implicada en asociaciones fuertes es menos susceptible o propensa para las actividades degradativas, tales como el crecimiento de microorganismos y las reacciones químicas de hidrólisis, que el agua débilmente asociada. El término «actividad del agua» (**aw**) se implantó para tener en

cuenta la intensidad con que el agua se asocia a los diferentes componentes no acuosos (Fennema, 1993).

La actividad acuosa, una proporción que especifica la pureza relativa del agua, mide cuántas veces más eficaz es el agua contenida en la semilla para promover una reacción acuosa bajo un contenido de humedad determinado ($\%H_2O$), en comparación con un estado de referencia estándar (en este caso, agua líquida pura). La actividad acuosa describe la tendencia a ocurrir de una reacción química que involucra agua a una temperatura determinada, puede interpretarse como el agua disponible para que ocurran reacciones químicas que dependen de la presencia de agua. Su valor es siempre menor o igual a uno (Vertucci y Roos, 1993).

Es razonable pensar al envejecimiento de la semilla como un conjunto de reacciones químicas o transiciones de fase; por lo tanto, la probabilidad de deterioro de la semilla puede relacionarse con su actividad acuosa. Mientras que las reacciones específicas involucradas en dicho deterioro de las semillas con el tiempo son desconocidas, si se sabe que el contenido de humedad ($\%H_2O$) es uno de los parámetros más importantes que determinan la tasa de envejecimiento de las mismas.

Hay diferentes maneras en las que el agua puede afectar el envejecimiento de las semillas. Se ha sugerido que la naturaleza de las reacciones químicas está definida por el comportamiento de fases del agua en las mismas (Vertucci y Roos, 1993), ya que puede conducir a un cambio en el comportamiento de las macromoléculas en fase o en las concentraciones efectivas de reactivos involucrados en el deterioro (macrocomponentes de la propia semilla).

Ambos parámetros, $\%H_2O$ y a_w , pueden relacionarse entre sí. Existen isotermas de sorción que describen la relación entre $\%H_2O$ y la humedad relativa (HR) a una temperatura dada (Vertucci y Roos, 1993).

La HR es igual a la presión de vapor relativa del agua (p/p_0) por cien. En fase vapor, a_w es igual a la presión parcial del vapor de agua (definida como la presión de vapor del agua pura (p_0) dividida por la presión total del sistema P) multiplicada por un factor de corrección (γ : coeficiente de fugacidad) para comportamientos no ideales de los gases ($a_w = p_0^* \gamma_0 / P$).

$$a_w = \frac{p_0 * \gamma_0}{P} \quad (3)$$

Donde P_0 y P son la presión del agua pura y la presión total del sistema respectivamente. γ_0 corresponde al coeficiente de fugacidad para comportamientos no ideales.

En un sistema donde se tienen solutos disueltos en fase acuosa, como lo es en el caso de la semilla, el a_w de ambas fases (líquida y vapor) disminuye. En éstas, el a_w es igual a la concentración de la solución dividida por la concentración del solvente puro, mientras que en fase vapor el a_w es igual a la presión parcial del agua sobre la solución (p/P) dividida por la presión parcial de agua sobre el líquido puro (p_0/P) multiplicado por los coeficientes de fugacidad, o:

$$a_w = \frac{p * \gamma}{p_0 * \gamma_0} = \frac{HR}{100} \quad (4)$$

En el equilibrio los potenciales químicos, y con ellos sus actividades, de ambas fases son iguales. Por lo tanto $HR/100$ es una buena aproximación de a_w en la solución. Así el contenido de humedad de la semilla está relacionado con la humedad relativa mediante isothermas de sorción, y la HR está relacionada con a_w por (4).

Es decir que es posible medir la humedad por medio de la RH ($a_w * 100$) o el $\%H_2O$. Numerosos estudios han documentado la existencia de un nivel óptimo de humedad para el almacenamiento de semillas (Vertucci y Roos, 1993).

El $\%H_2O$ en el que el secado adicional no proporciona beneficios adicionales (en términos de longevidad de la semilla), o en el que se observan efectos perjudiciales (en términos de vigor de semilla), varía entre especies según su composición química (Vertucci y Roos, 1993). Los resultados obtenidos durante este trabajo corresponden a semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. Chadwick, origen: chacra experimental Gorina.

Además de considerar el %H₂O y aw, se deben considerar otras variables de interés durante el almacenamiento y procesamiento de las semillas, tales como la temperatura por su gran influencia en la cinética de todo tipo de reacciones químicas, y el tiempo. Durante el procesamiento interesa el tiempo requerido para la evaporación del agua contenida en la semilla hasta un valor de humedad óptimo. Durante el almacenamiento se desea conocer el tiempo que puede mantenerse la semilla con un nivel dado de calidad, en función de los cambios integrales químicos y/o microbiológicos que tienen lugar durante este período, para determinar la vida de almacenamiento específica de la semilla (Fennema, 1993).

De acuerdo al Manual de producción de semillas hortícolas (Argerich y Gaviola, 1995), los principios del almacenamiento son:

- Las semillas no mejoran su calidad con el almacenamiento;
- La conservación depende de la humedad de la semilla, en primer lugar, y de la temperatura en segundo término;
- Cada 1% que disminuye la humedad de las semillas se duplica el tiempo de conservación (en el rango de 4-14%);
- Cada 5,5 °C que disminuye la temperatura se duplica la conservación (en el rango de 0-40°C);
- Las condiciones frescas y secas son las mejores para la conservación de la viabilidad;
- Se debe mantener la higiene de los depósitos;
- El potencial de almacenamiento depende de la especie y el cultivar. La zanahoria, la cebolla y el pimiento son hortalizas con baja capacidad de conservación; por el contrario la arveja, las cucurbitáceas y el tomate poseen una conservación prolongada. Se cita un caso con semillas de tomate cv. Marmon que poseía un 82% de poder germinativo luego de 60 años de almacenamiento.
- Los lotes de alta calidad poseen mayor potencial de germinación que los de baja calidad.

En un banco de germoplasma el almacenamiento se realiza en condiciones óptimas para maximizar la viabilidad de las accesiones (semillas). En una colección activa (5% de humedad a una temperatura entre 0-4°C) las accesiones se mantienen en condiciones menos estrictas que en una colección de base (3-4% de humedad, envases herméticos a -18°C) y con mucho más fácil acceso. Es posible que haya que sembrar este material con mayor frecuencia para caracterizarlo y evaluarlo; además debe estar disponible para ser distribuido a los usuarios (Engels y Visser, 2007), en el caso del BdG de la facultad de Cs. Exactas-UNLP, a los productores del cinturón frutihortícola de La Plata.

SECADO CON ESTUFA

Objetivo:

Disminuir el contenido de humedad de las semillas (%H₂O) y actividad acuosa (aw) hasta un contenido óptimo para su conservación a 4°C y determinar el tiempo que éstas tardan en alcanzar dicho valor. De acuerdo al Manual de producción de semillas hortícolas (Argerich & Gaviola, 1995) en una *colección activa* las semillas deben tener un 5% de humedad cuando se las almacena a una temperatura entre 0- 4°C.

Fundamento:

El secado con estufa se fundamenta en la diferencia de humedades relativas (**HR**) entre la semilla y el microambiente de secado. Inicialmente la semilla se encuentra en equilibrio con el ambiente, por lo que el aire antes de ingresar al dispositivo de secado (estufa u horno) y la semilla tienen la misma humedad relativa.

A partir de la interpretación de la tabla psicométrica (Figura 1), para un mismo contenido de agua en el aire (humedad específica), se observa que al aumentar la temperatura disminuye la HR del mismo. Por lo que el aire en el interior de la estufa posee una HR menor y entonces la semilla deja de estar en equilibrio con el ambiente de secado, siendo esta la fuerza impulsora para que el flujo de agua sea desde la semilla hacia el ambiente.

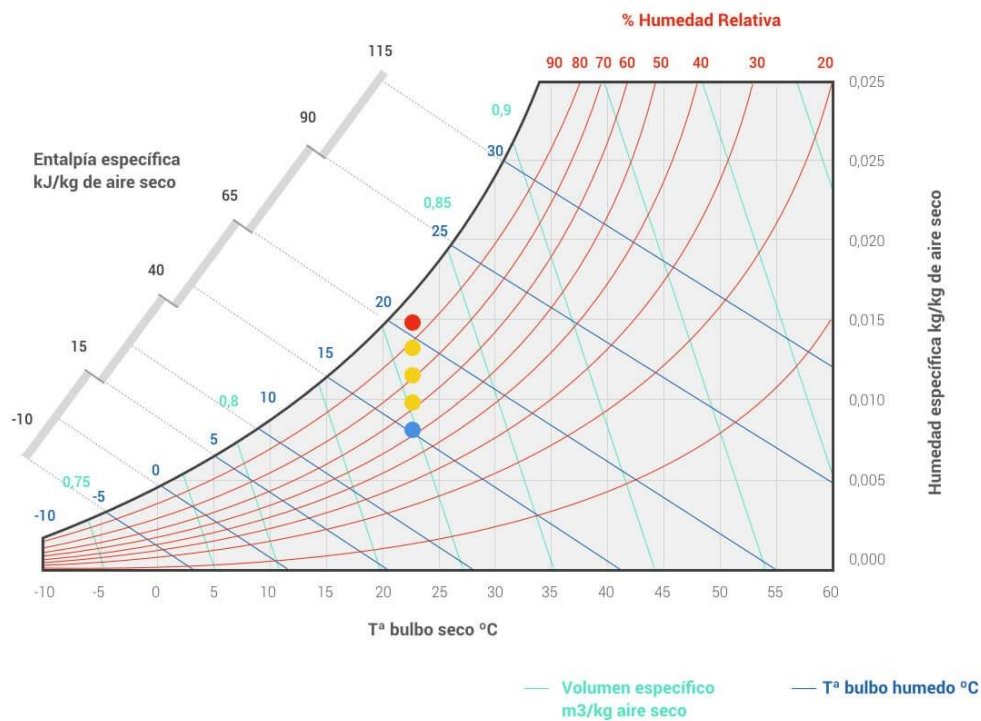


Figura 1. Tabla Psicométrica.

Materiales:

- Cápsulas plásticas del equipo aqualab.
- Recipientes metálicos o de porcelana.
- Balanza analítica digital
- Pinza y cuchara
- Estufa de convección con temperatura 40 $^\circ\text{C}$ y 95 $^\circ\text{C}$ (solo en caso de hacerlo destructivo)
- Equipo para medir actividad acuosa (**aw**) (Aqualab, 4TEV, USA).

Método: Determinación gravimétrica.

En primer lugar tomar una alícuota al azar de la muestra y determinar el contenido de sólidos totales de la semilla (**ST t_0**) y su actividad acuosa (**aw t_0**) al tiempo inicial del ensayo.

Secar un recipiente metálico o de porcelana en la estufa a 110°C hasta peso constante, dejar enfriar y registrar su masa (**MRe**).

Colocar una masa definida de semillas (**MH**) en dichos recipientes de masa conocida (**MRe**) e introducirlos en estufa respetando cualquiera de los siguientes pares de tiempo y temperatura:

- 35°C durante las primeras cinco horas y a 40°C en los tiempos siguientes hasta las diez horas (Argerich y Gaviola, 1995).
- Temperatura constante de 40°C durante diez horas. Método de Argerich y Gaviola (1995), modificado en nuestro laboratorio.

Para optimizar el proceso en términos de ahorro de tiempo y energía, se puede determinar un tiempo de secado que depende del tipo de muestra y del contenido inicial de humedad de la semilla. Puede estimarse dicho tiempo a partir de la ecuación de ajuste para MR en función del tiempo correspondiente (5).

$$t = \sqrt[n]{\frac{\ln(MR)}{-k}} \quad (5)$$

Donde k es la constante de la tasa de secado en horas^{-1} , y n es un exponente adimensional. Ambos parámetros se definen para cada condición de secado y variedad de semilla (Sogi y col., 2003).

Una vez que inicia el conteo del tiempo del secado (t_0), es importante que los sistemas se mantengan abiertos durante todo el proceso para permitir el intercambio de materia entre las semillas y el aire seco.

Transcurrido el tiempo de secado, determinar la masa de semillas secas (**MS**) contenida en el recipiente (**MS + MRe**), y medir su actividad acuosa (**aw**).

Si se desea trazar una curva de secado, seguir los pasos detallados previamente hasta iniciar el conteo del tiempo de secado (t_0) y retirar cada recipiente y su duplicado a los tiempos estipulados (t_i). Determinar el peso de la masa de semilla secada al t_i contenida en el recipiente (**MS t_i + MRe**), y medir su actividad acuosa al t_i (**aw t_i**). Se

proponen al menos seis puntos en la curva correspondientes a los tiempos 1 h, 3 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h.

Se proponen dos maneras de determinar este ensayo:

i) Ensayo destructivo: una vez determinada la a_w de las semillas secas al final del proceso, aplicar protocolo de “determinación de sólidos totales” para obtener por diferencia de pesada el dato de sólidos totales (ST). para cada muestra sometida al tratamiento de secado (Figura 2).

ii) Ensayo no destructivo: Las muestras se conservan viables, almacenadas correctamente para futuros ensayos. Se calcula el contenido de sólidos totales (**ST**) a partir del contenido de humedad en base húmeda (%H₂O (bh)) calculado a partir del dato de sólidos totales (**ST**) determinado una única vez (por duplicado) sobre una muestra representativa del lote de semillas (Figura 3).

Cálculos:

La masa de agua se determina por diferencia de pesada entre la masa de semilla inicial previa al secado (**MH**) y la masa de semilla seca (**MS**).

$$\%H_2O(bh) = \frac{\text{masa } H_2O \text{ ti}}{MH} = \frac{MH - MS \text{ ti}}{MH} \quad (6)$$

$$\% H_2O (bs) = \frac{\text{masa } H_2O \text{ ti}}{ST} = \frac{MH - MS \text{ ti}}{ST} \quad (7)$$

ST calculado:

- Dato necesario: %H₂O (bh) de las semillas a t_0 .
- Cálculo:

$$ST \text{ (calculado)} = MH - \left(MH * \frac{\%H_2O (bh)}{100} \right) \quad (8)$$

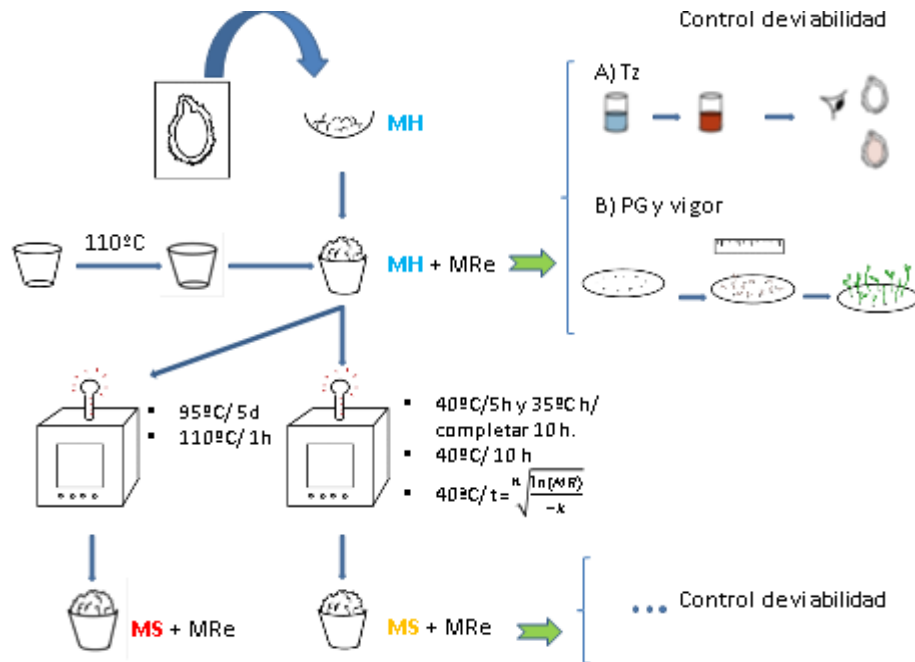


Figura 2. Esquema de protocolo de secado en estufa – Método destructivo. Donde, MH: masa de semillas húmedas; MRe: masa de recipiente metálico/vidrio/porcelana; MS: masa de semillas secas; PG: poder germinativo; Tz: test de tinción con tetrazolio.

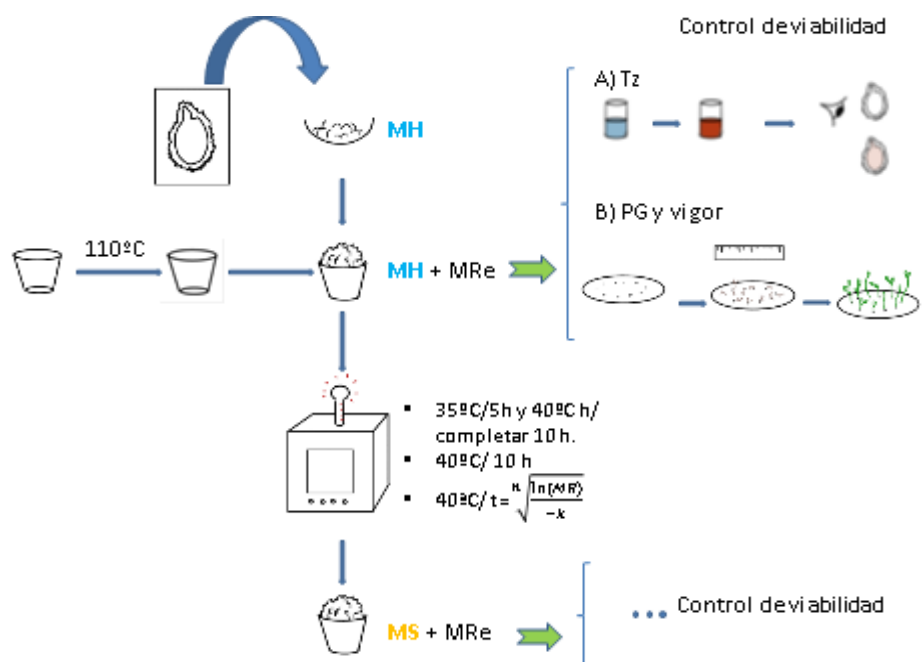


Figura 3. Esquema de protocolo de secado en estufa – Método no destructivo. Donde, MH: masa de semillas húmedas; MRe: masa de recipiente metálico/vidrio/porcelana; MS: masa de semillas secas; PG: poder germinativo; Tz: test de tinción con tetrazolio.

DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS TOTALES

Objetivo:

Determinar el peso de la semilla debido únicamente sus componentes sólidos.

El fundamento es el explicado para secado se semillas por corriente de aire seco en el protocolo de “Secado en estufa”.

Materiales:

- Recipiente metálico o de porcelana.
- Balanza analítica digital
- Pinza y cuchara
- Estufa de convección a temperatura de 95 y 110°C.

Método: Determinación gravimétrica.

Secar un recipiente metálico o de porcelana en la estufa a 110°C hasta peso constante, dejar enfriar y registrar su masa (**MRe**).

Colocar una masa definida de semillas (**MH**) en dichos recipientes de masa conocida (**MRe**) e introducirlos en estufa respetando cualquiera de los siguientes pares de tiempo y temperatura:

- Temperatura constante de 95°C durante 5 días (Calderón Piñar, 2009).
- Temperatura constante de 130°C durante 1 hora (Calderón Piñar, 2009).

Una vez que inicia el conteo del tiempo del secado (t_0), es importante que los sistemas se mantengan abiertos durante todo el proceso para permitir el intercambio de materia entre las semillas y el aire seco.

Transcurrido el tiempo de secado, determinar la masa de semillas secas (**MS**) contenida en el recipiente (**MS + MRe**).

Cálculos:

El contenido de sólidos totales de la semilla se calcula por diferencia de pesadas:

$$ST = (MS + MRe) - MRe \quad (9)$$

SECADO CON SALES

Objetivo:

Disminuir el contenido de humedad de las semillas (%H₂O) y actividad acuosa (aw) hasta un contenido óptimo para su conservación a 4°C y determinar el tiempo que éstas tardan en alcanzar dicho valor. De acuerdo al Manual de producción de semillas hortícolas (Argerich y Gaviola, 1995) en una *colección activa* las semillas deben tener un 5% de humedad cuando se las almacena a una temperatura entre 0-4°C.

Fundamento:

Las soluciones saturadas de diferentes sales poseen una presión de vapor definida para cada sal en equilibrio con el ambiente a una temperatura constante (Ballesteros y Walters, 2007).

Tabla 1. Humedad relativa (HR) obtenida por diferentes soluciones de sales saturadas incubadas a diferentes temperaturas. (Fuente: Vertucci y Ross, 1993).

Salt	Temperature (°C)			
	5	15	25	45
P ₂ O ₅	0.5	0.5	0.5	0.5
ZnCl ₂	5.5	5.5	5.5	5.5
LiCl	15	13	13	11
K. acetate	26	—	25	19
MgCl ₂	33.5	—	33	31.5
K ₂ CO ₃	47	—	43	39
Ca(NO ₃) ₂	61	—	50.5	40
Mg(NO ₃) ₂	—	—	53	—
NH ₄ NO ₃	—	—	62	50
NaNO ₂	—	—	64	60
NaCl	75.5	—	75	75
KCl	88	—	85	81
KNO ₃	93	—	91	87
KH ₂ PO ₄	—	—	—	92.8
K ₂ SO ₄	—	—	—	96

Para el secado, se construye un sistema cerrado que contiene una solución saturada de sal en equilibrio, dentro del cual se introducen las semillas durante un tiempo determinado a temperatura constante (23°C). Se buscan sales que determinen una presión de vapor en el microambiente menor que la presente en la semilla, así el flujo de vapor de agua será en el sentido semilla ambiente, disminuyendo entonces el contenido de humedad de la semilla.

El contenido de humedad se determina gravimétricamente y se expresa como g H₂O/ g de peso seco. El peso seco se determina por secado de las semillas a 95°C durante 5 días.

Materiales:

- Cloruro de Litio (puro, título >99,0%. Biopack-Argentina).
- Cloruro de Zinc (Anhidro, pro-análisis. Cicarelli-Argentina).
- Agua destilada
- 24 frascos de vidrio con tapa hermética
- 24 tubos de PVC (3 cm de diámetro x 2 cm de alto) que sirven de soporte
- 24 cápsulas plásticas
- Balanza analítica digital
- Pinza y cuchara
- Incubadora frío-calor programable (Incubadora de temperatura controlada y fotoperíodo), con iluminación, marca INGELAB modelo I-316PF. En caso de no tener acceso a este equipo se pueden incubar las semillas en una estufa a temperatura constante.
- Estufa 95°C (solo en caso de hacer el análisis destructivo).
- Equipo para medir actividad acuosa (aw) (Aqualab, 4TEV, USA).

Método:

En primer lugar tomar una alícuota al azar de la muestra y determinar el contenido de sólidos totales de la semilla (**ST**) y su actividad acuosa (**Aw t₀**) al tiempo inicial del ensayo.

Preparar un frasco en equilibrio con la sal elegida (cloruro de litio o cloruro de cinc) tal como se describe a continuación. Disolver la sal dentro del frasco correspondiente con agua destilada, asegurando que quede un exceso de sal sin disolver. Agitar en shaker para favorecer la disolución. Deberá quedar una película de aproximadamente 1 cm de espesor en la base de cada frasco, la cual estará constituida por un sistema heterogéneo solución saturada/sal sólida. Los frascos quedarán tapados herméticamente dentro de la cámara de cultivo a temperatura constante aproximadamente 14 días, durante este tiempo las soluciones se equilibrarán con el microambiente de cada recipiente. Controlar que en todo momento se tengan sistemas compuestos por dos fases en cada frasco (solución saturada/sal sólida), de lo contrario evaporar agua de la solución colocando el frasco en estufa a 40°C, o bien agregar masa de sal a la solución y homogeneizar hasta observar dos fases nuevamente. Para asegurar un cierre hermético de los frascos se puede utilizar parafilm®.

Una vez lograda cierta estabilidad en el sistema en equilibrio con solución de sal, iniciar el secado de la semilla. Para esto colocar una masa definida de semillas (**MH**) en una base de plástico de masa conocida (**PB**), registrar los datos. Introducir la base que contiene la masa de semillas en el frasco estabilizado con la sal en equilibrio. Las semillas no deben tener contacto con la solución, para esto apoyar la base de plástico que las contiene sobre un soporte de PVC que supera la altura de la solución (Figura 4).



Figura 4. Ilustración de armado de las unidades de secado compuestas por solución saturada/ sal sólida/ semilla.

El conteo del tiempo del secado (t_0) inicia cuando el sistema cerrado está compuesto por solución saturada/sal sólida/semilla. Los sistemas se mantienen herméticos durante todo el experimento a temperatura constante dentro de la cámara de cultivo. Partiendo del t_0 respetar el tiempo de secado indicado para cada sal, el cual dependerá del tipo de muestra y del contenido de humedad inicial de la semilla. Puede estimarse dicho tiempo a partir de la ecuación de ajuste para MR en función del tiempo correspondiente (10).

$$t = \sqrt[n]{\frac{\ln(MR)}{-k}} \quad (10)$$

Donde k es la constante de la tasa de secado en horas^{-1} , y n es un exponente adimensional. Ambos parámetros se definen para cada condición de secado y variedad de semilla.

Una vez transcurrido el tiempo de secado, determinar la masa de semillas secas (**MS**) contenida en la base plástica (**MS + PB**), y medir su actividad acuosa (**aw**).

Si se quiere construir una curva de secado, preparar dos series de 12 frascos de vidrio, una correspondiente al equilibrio de LiCl y la otra al de ZnCl₂, tal como se especificó en este protocolo. Cada serie incluye 6 tiempos por duplicado. Rotular cada frasco con el nombre de la serie y el tiempo correspondiente como se muestra a continuación:

Serie 1	LiCl t_1	LiCl t_1'	LiCl t_2	LiCl t_2'	LiCl t_3	LiCl t_3'	LiCl t_4	LiCl t_4'	LiCl t_5	LiCl t_5'	LiCl t_6	LiCl t_6'
Serie 2	ZnCl ₂ t_1	ZnCl ₂ t_1'	ZnCl ₂ t_2	ZnCl ₂ t_2'	ZnCl ₂ t_3	ZnCl ₂ t_3'	ZnCl ₂ t_4	ZnCl ₂ t_4'	ZnCl ₂ t_5	ZnCl ₂ t_5'	ZnCl ₂ t_6	ZnCl ₂ t_6'

Colocar una masa definida de semillas (**MH**) en cada base de plástico de masa conocida (**PB**), dentro de los sistemas estabilizados. Registrar los datos en la planilla.

Una vez que el sistema cerrado está compuesto por solución saturada/sólida/semilla inicia el conteo del tiempo del secado (t_0). Los sistemas se mantienen herméticos durante todo el experimento a temperatura constante dentro de la cámara de cultivo.

Retirar cada frasco y su duplicado a los tiempos estipulados (t_i) y determinar el peso de la masa de semilla seca al t_i contenida en la base plástica (**MS t_i + PB**), actividad acuosa de la semilla a dicho tiempo (**aw t_i**).

Se proponen dos maneras de determinar este ensayo:

i) Ensayo destructivo: una vez determinada el aw de las semillas secas al final del proceso, aplicar protocolo de “determinación de sólidos totales” para obtener por diferencia de pesada el dato de sólidos totales (ST). para cada muestra sometida al tratamiento de secado (Figura 5).

ii) Ensayo no destructivo: Las muestras se conservan viables, almacenadas correctamente para futuros ensayos. Se calcula el contenido de sólidos totales (**ST**) a partir del contenido de humedad en base húmeda (%H₂O (bh)) calculado a partir del dato

de sólidos totales (**ST**) determinado una única vez (por duplicado) sobre una muestra representativa del lote de semillas (Figura 6).

Cálculos:

$$\%H_2O(bh) = \frac{\text{masa } H_2O \text{ ti}}{MH} = \frac{MH - MS \text{ ti}}{MH} \quad (11)$$

$$\% H_2O (bs) = \frac{\text{masa } H_2O \text{ ti}}{ST} = \frac{MH - MS \text{ ti}}{ST} \quad (12)$$

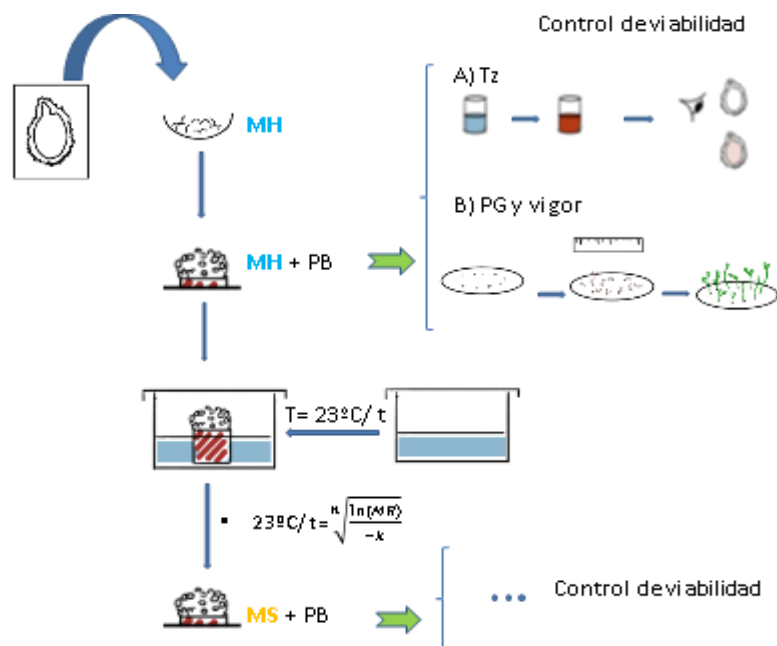
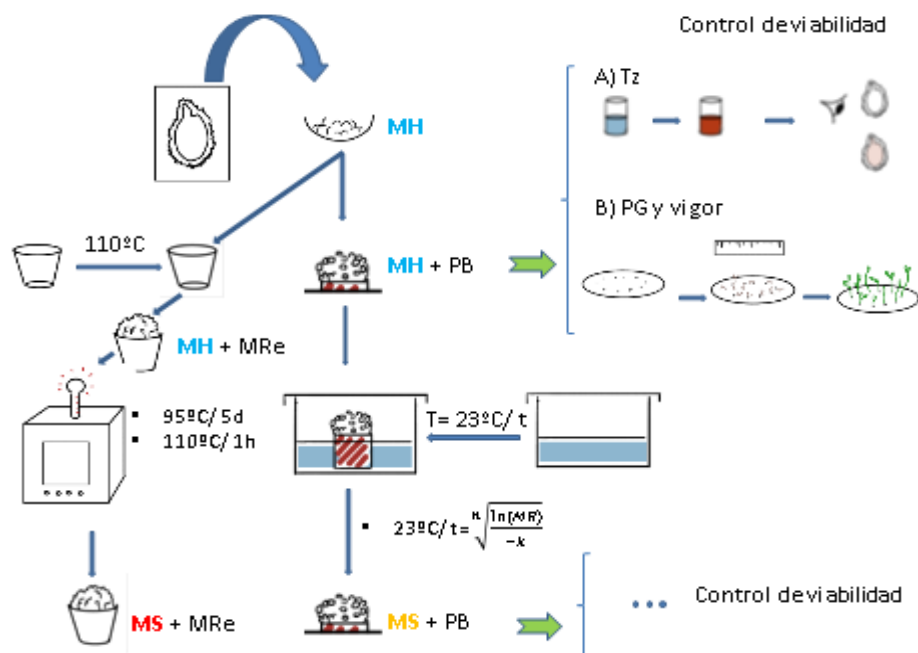
ST calculado:

- Dato necesario: %H₂O (bh) de las semillas a t₀.
- Cálculo:

$$ST \text{ (calculado)} = MH - \left(MH * \frac{\%H_2O (bh)}{100} \right) \quad (13)$$

Referencias:

- MH: masa de semilla húmeda (masa inicial, previa a tratamiento de secado).
- MS: masa de semilla seca por tratamiento (combinación de tiempo y temperatura de secado).
- ST: Sólidos totales de la semilla. Masa de semilla que posee un contenido de humedad de cero por ciento (H₂O= 0%)



CONTROL DE LA VIABILIDAD DE LAS SEMILLAS

Objetivo: Control de calidad de procesamiento mediante diferentes parámetros: Poder germinativo, vigor y test de tetrazolio.

I. PODER GERMINATIVO Y VIGOR

El poder germinativo (PG) permite determinar la viabilidad de las semillas. Esto es de interés cuando se quiere evaluar el efecto de un determinado procesamiento, en este caso el secado de la semilla. Para eso se determina el poder germinativo antes y después del procesamiento y se comparan los resultados. El poder germinativo de una determinada semilla nunca aumenta, se espera que este valor se mantenga constante antes y después de un buen procesamiento. Cuanto más parecido sea el valor del poder germinativo post-procesamiento al del pre-procesamiento, se habrá perdido menor viabilidad durante el mismo (Argerich y Gaviola, 1995).

El vigor es una medida de la “fuerza” que tiene la semilla para germinar, y es utilizado también como control de procesamiento. A pesar de que la longevidad de las semillas mejora en condiciones de baja temperatura y humedad eventualmente estas se deterioran y pierden capacidad de germinar. El mecanismo por el cual las semillas pierden su potencial de germinación no está bien dilucidado, pero la mayoría de las hipótesis postulan la ruptura de macromoléculas de la célula. Bajo condiciones de almacenamiento de baja humedad, el metabolismo de las semillas está restringido, por lo tanto las reacciones de deterioro parecen ser estocásticas (Vertucci, 1992).

Fundamento:

En la semilla madura el embrión detiene su crecimiento, las sustancias de reserva alcanzan su máxima cantidad y las estructuras de protección están perfectamente desarrolladas. Desde el cuaje a la maduración, las semillas van adquiriendo distintas capacidades en tiempos diferentes. La primera que adquieren es la capacidad de

germinar, luego la resistencia al secado, posteriormente el vigor y por último la capacidad de almacenamiento (Figura 7).

Un concepto generalizado es que la cosecha de la semilla debe hacerse cuando estas alcanzan el máximo peso seco, ya que sería el momento de mayor calidad fisiológica (Argerich y Gaviola, 1995).

La biología de las especies permite definir métodos apropiados de conservación y precisar los requisitos de un banco de germoplasma (Engels y Visser, 2007). Estos procesamientos, así como el tiempo de almacenamiento, repercuten en cierto grado en el deterioro en la semilla, es por eso que las medidas de poder germinativo y vigor son indispensables para evaluar el potencial de almacenamiento de la semilla, siendo útiles también para el control de procesamiento de las mismas en un BdG.

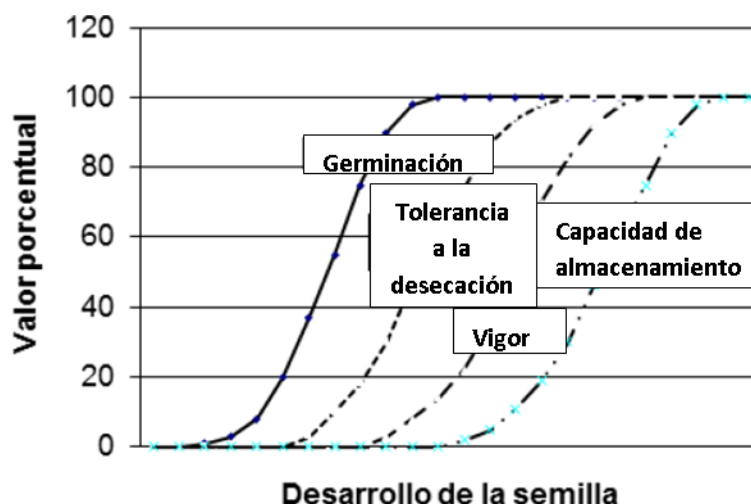


Figura 7. Capacidades fisiológicas que adquieren las semillas durante su desarrollo.
(Fuente: Argerich y Gaviola, 1995).

Materiales:

- 10 cajas de Petri plásticas con tapa (diámetro = 10 cm)
- 10 círculos de papel de filtro (diámetro = 10 cm)
- 30 círculos de papel absorbente común (diámetro = 10 cm)
- 10 tiras de Parafilm® de longitud tal que llegue a dar 2 vueltas al perímetro de la caja cuando se estira.

- 100 unidades de semillas.
- Pulverizador con agua de red.
- Marcador indeleble.
- Incubadora frío-calor programable (Incubadora de temperatura controlada y fotoperiodo), con iluminación, marca INGELAB modelo I-316PF. En caso de no tener acceso a este equipo se pueden incubar las semillas en una estufa a temperatura constante.

Método:

Preparar las cámaras individuales donde se realizará el test: colocar tres círculos de papel absorbente superpuestos en la base de la caja de Petri y sobre los mismos añadir un círculo de papel de filtro. Quedarán en total cuatro capas de papel.

Rotular las tapas de cada caja con un número del 1 al 10 y la fecha de inicio del ensayo. Al costado de la base de las cajas dibujar una flecha que indique el inicio y el sentido en el que se contarán las semillas los siguientes días del ensayo.

Sobre el papel de filtro apoyar 10 semillas dispuestas de manera concéntrica, y equidistantes entre sí. Es importante que no queden tocando las paredes de la caja de Petri, se debe dejar alrededor de un cm de distancia entre el contorno de la caja y las semillas; esto facilitará luego la medida de la longitud de las raíces (Figura 8).

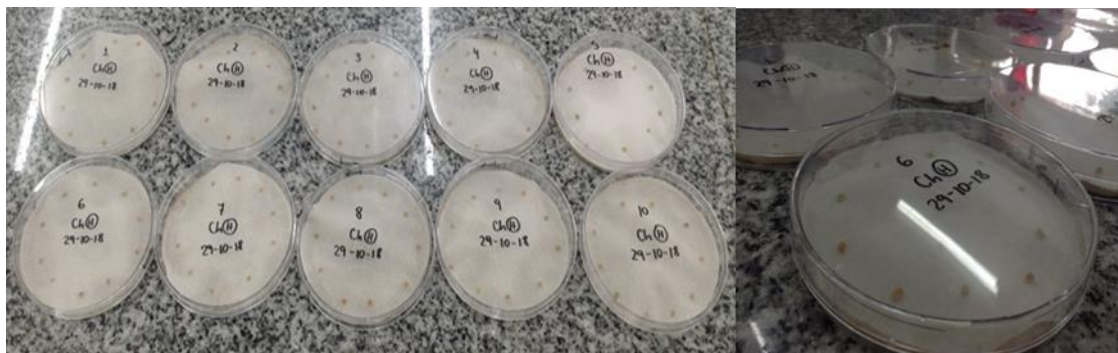


Figura 8. Disposición de los materiales en el armado de las cajas Petri para iniciar las pruebas de poder germinativo y vigor.

Una vez organizadas las semillas, rociarlas con agua potable de red utilizando un pulverizador de manera que la cantidad de agua sea controlada y homogénea en la placa. No deben regarse las semillas en exceso ni en defecto, el punto justo es cuando el papel de filtro se vea brillante al iluminarlo con una linterna.

Tapar la caja y sellarla con dos vueltas de Parafilm®, para asegurar la menor pérdida de humedad posible (Figura 9).



Figura 9. Colocación de Parafilm® de tal forma que cubre la unión entre la base y la tapa de la caja de Petri para evitar el flujo de masa de agua desde el interior hacia el ambiente.

Repetir el procedimiento con las diez cajas y colocarlas todas al mismo tiempo dentro de la cámara de cultivo (Temperatura de 23°C y fotoperíodo 8-16).

Incubar durante 14 días realizando conteos en tiempos intermedios. Estos tiempos están determinados en función de la calidad de las semillas analizadas, lo que determina la velocidad y fuerza con que estas germinan, y por lo tanto la periodicidad de las observaciones. Controlar durante todo el experimento el contenido de humedad de las cajas y regar las semillas cuando sea necesario.

Realizar la medida del largo de las raíces una vez que la mayoría de las semillas hayan germinado y antes de la aparición del cotiledón.

Ejemplo: en el caso de la semilla de tomate Chadwick, realizar conteos a las 48, 72 y a las 96 h y a los 14 días, tal como se muestra en la figura 10.

- A las 48 h contar cuantas semillas germinaron en cada placa, registrándolas como cantidad de semillas sobre 10.
- A las 72 h medir el largo de las raíces con un calibre, expresándolo en milímetros (mm). En caso de no haber germinación, registrar esa semilla con un 0 (cero).
- A las 96 h y a los 14 días registrar nuevamente cuántas semillas germinaron por placa.

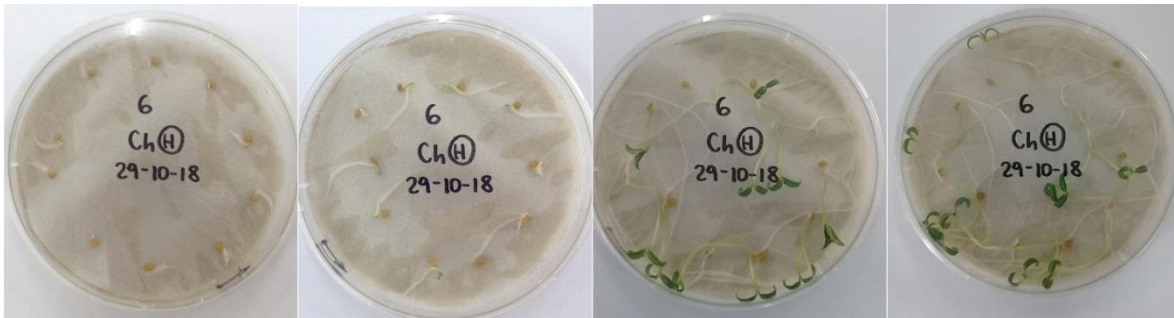


Figura 10. Ejemplo de evolución de crecimiento de las plántulas a los diferentes tiempos de conteo (48, 72 y 96 horas y 14 días).

El registro se realiza en tablas que permiten un seguimiento individual de cada semilla, se puede tomar el siguiente modelo (Tabla 2):

Tabla 2. Ejemplo: Ordenamiento de los datos de longitud de radícula y semillas germinadas para cada placa en los diferentes tiempos de conteo del experimento.

	Semilla	24h. 30/10/18	72h. 01/11/18 (mm)	X (mm)	96h. 02/11/18	14 días
PLACA 1	1	4 c/raíz	5,26	5,811	10/10 con raíz	10/10 con raíz
	2		2,93			
	3		7,77			
	4		1,87			
	5		13,33			
	6		7,37			
	7		6,59			
	8		1,66			
	9		1,61			
	10		9,72			

Cálculos:

A) Poder germinativo:

Es determinado a partir de los datos del último día de conteo (día 14).

$$\% \text{ germinación} = \frac{n \text{ semillas germinadas (14 días)}}{n \text{ semillas totales}} * 100 = \text{frec(día14)} * 100 \quad (14)$$

B) Vigor:

Es determinado mediante la germinación a 23°C por 72 h/96 h (según tiempo en el que se hayan tomado las medidas del largo de las raíces) de una alícuota de 100 semillas. El vigor es expresado como un índice de germinación en el cual el promedio de la longitud de las radículas es multiplicado por el porcentaje de germinación (Vertucci, 1992).

$$\text{Vigor} = \text{longitud promedio de radículas} * \% \text{germinación} \quad (15)$$

Análisis de datos:

Una vez calculados los parámetros de porcentaje de germinación (frecuencia x 100) y vigor para el n total de semillas (n=100) se pueden analizar estadísticamente los datos. En el caso de querer comparar distintos tratamientos aplicados a la semilla para el parámetro germinación, los datos que provienen de una distribución binomial, deben ser transformados a una distribución normal mediante la función arcoseno para poder llevar a cabo el ANAVA (Kuehl, 2000). En el caso del parámetro vigor, al ser un dato continuo se puede hacer el ANAVA directamente, previo control de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos.

Tabla 3. Ejemplo: Ordenamiento de los datos de semillas germinadas y porcentaje de germinación de cada una de las 10 placas totales en los diferentes tiempos de conteo del experimento. El valor promedio del porcentaje de germinación a los diferentes tiempos de observación se indica con color bordo al final de la columna correspondiente, siendo el valor del poder germinativo definitivo determinado a los 14 días de iniciado el test, según normas ISTA.

Placa	24 h	72 h	14 días	Frecuencia	PG24h	PG72h	PG 14días	Transformada
1	4	10	10	1	0,4	1	100	90,00
2	2	10	10	1	0,2	1	100	90,00
3	2	10	10	1	0,2	1	100	90,00
4	4	9	9	0,9	0,4	0,9	90	71,57
5	2	10	10	1	0,2	1	100	90,00
6	6	10	10	1	0,6	1	100	90,00
7	2	10	10	1	0,2	1	100	90,00
8	5	9	10	1	0,5	0,9	100	90,00
9	4	10	10	1	0,4	1	100	90,00
10	5	9	10	1	0,5	0,9	100	90,00
					0,36	0,97	99,00	88,16

Tabla 4. Ejemplo: Ordenamiento de los resultados obtenidos para PG y vigor.

Tratamiento	longitud promedio de radículas	vigor	PG
NINGUNO	6,52	646,09	99

II. TEST DE TETRAZOLIO

Fundamento:

En los embriones de las semillas, el colorante permite diferenciar los tejidos vivos de los muertos en base a la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración). Al hidratar las semillas, la actividad de las deshidrogenasas incrementa, resultando en la liberación de protones (H^+) con la consecuente reducción del colorante tetrazolio incoloro (2,3,5- triphenil tetrazolum chloride) a formazán. Solamente las células vivas poseen actividad deshidrogenasa, por lo que el formazán las tiñe de color rojo, en tanto que las muertas permanecen sin colorear. La viabilidad de las semillas se determina en función del patrón de tinción del embrión e intensidad de la coloración. Que una semilla sea viable, nos indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal, sin embargo podría estar dormida, y en ese caso no germinaría inmediatamente (Ruiz, 2009).

Materiales:

- Cloruro de 2,3,5- trifenil de tetrazolio.
- Solución buffer fosfato pH= 6,5- 7,5 preparada a partir de dos partes de solución 1 y tres partes de solución 2.
 - Solución 1: 9.078 g KH_2PO_4 en 1000 mL de agua destilada.
 - Solución 2: 9.472 g Na_2HPO_4 en 1000 mL de agua destilada, o 11.876 g $Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$ en 1000 mL de agua destilada.
- Recipientes oscuros. Por ejemplo, envases de rollos fotográficos.
- Agua destilada.
- Pinza
- Bisturí
- Balanza analítica
- Lupa con aumento del lente ocular 10X.

Método:

En primer lugar preparar una solución acuosa 1,0% p/v de cloruro de 2,3,5- trifenil de tetrazolio, para eso disolver una masa de sal de tetrazolio en un volumen de buffer

fosfato de pH = 6,4 determinados para alcanzar la concentración deseada. Por ejemplo: 1 g de sal cada 100 mL de buffer. Verificar que el pH final de la solución sea de 6.5–7.5.

La solución preparada puede ser almacenada en la oscuridad entre 5–10°C hasta un año.

Colocar las semillas en los envases oscuros y remojar durante 24 horas en agua destilada. Realizar un corte con bisturí en cada semilla para permitir el ingreso del colorante al interior de las mismas (Figura 11). Eliminar el exceso de agua, luego cubrirlas completamente con la solución de tetrazolio durante 42 horas a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Cortar longitudinalmente cada semilla luego de la tinción y analizar el resultado mediante la observación en lupa.

Análisis de resultados:

Un cambio de coloración de blanca a roja del embrión de las semillas indica viabilidad de las mismas. En contraste si no se observa cambio de coloración luego de la tinción, donde el embrión permanece blanco, indica no viabilidad de la semilla.

Los tiempos y temperaturas de los protocolos I. y II. que se aplican para la evaluación de la viabilidad de las semillas se esquematizan en la figura 12.

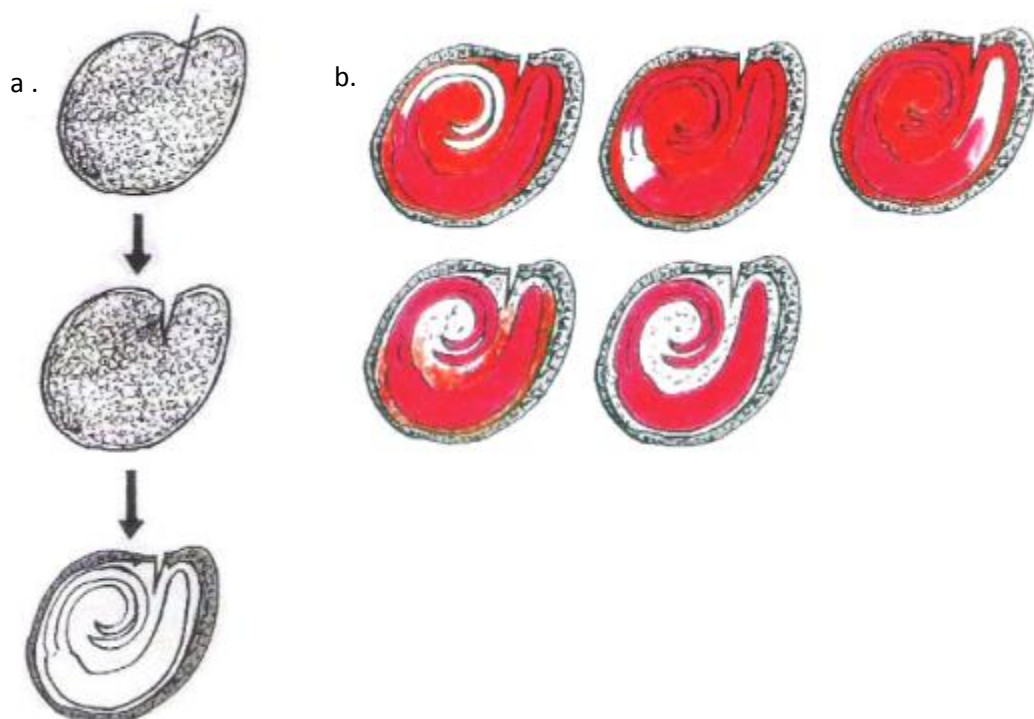


Figura 11. (a) Pasos de preparación de la semilla. (b) Evaluación: ejemplos de semillas no viables. (Fuente: Working sheet Tetrazolium Testin, Vol.1 (ISTA, 2003)).

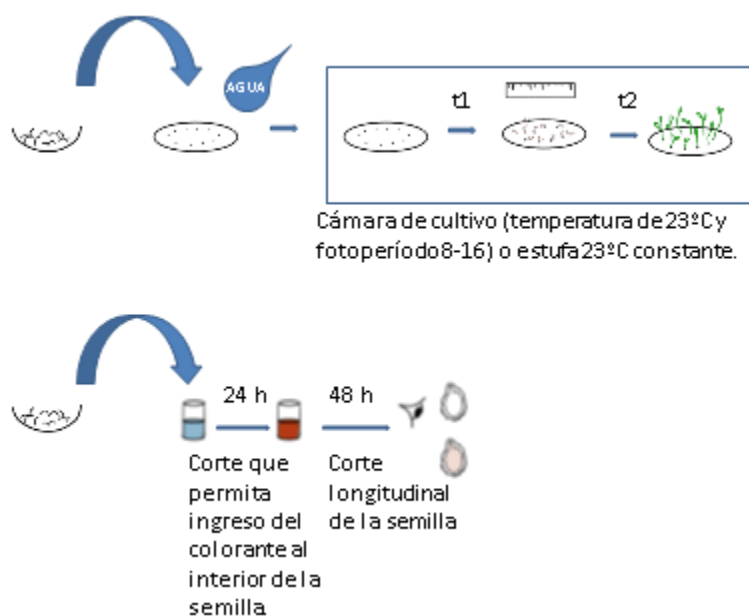


Figura 12. Esquema de los protocolos I. PG y vigor; II. Test de tetrazolio. Donde, PG: poder germinativo; t_1 : tiempo de medida del largo de las radículas para el cálculo de vigor; t_2 : tiempo de conteo de semillas germinadas versus semillas totales (t_2 = 14 días, según ISTA).

SECADO EN ESTUFA

A partir de dos experimentos realizados acorde al protocolo “secado en estufa” se obtuvieron los datos de porcentaje de humedad en base seca (%H₂O bs), relación de humedades (MR), y actividad acuosa (aw) ordenados en las diferentes graficas que se describen en esta sección.

Los experimentos fueron realizados bajo dos condiciones distintas de temperatura, y a partir de dos lotes de semillas de tomate var. Chadwick que diferían solamente en su contenido de humedad inicial. El experimento A se realizó a partir de un lote de semillas que poseía 9.33 %H₂O (bs) inicial y el proceso de secado en estufa fue de 35°C durante las primeras cinco horas y a 40°C en los tiempos siguientes hasta las diez horas. El experimento B se realizó a partir de un lote de semillas que poseía 8.61 %H₂O (bs) inicial y el proceso de secado en estufa fue a temperatura constante de 40°C durante diez horas.

Cuando se grafica %H₂O vs tiempo, en ambos casos (Figuras 13 y 14) se observa un descenso del %H₂O a medida que se avanza en el tiempo. A tiempos cortos el descenso de %H₂O es más rápido y luego decrece hasta alcanzar un valor constante, considerado como el contenido de agua de la semilla en el equilibrio.

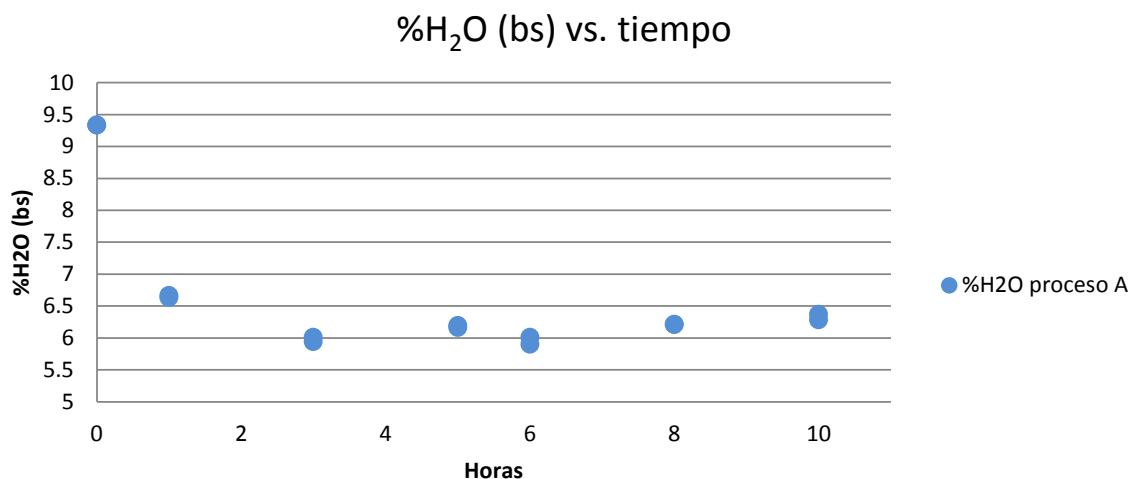


Figura 13. Porcentaje de agua expresado en base seca versus tiempo en horas. Proceso: secado en estufa a 35° hasta t= 5h y luego a 40°C hasta las 10 horas de secado.

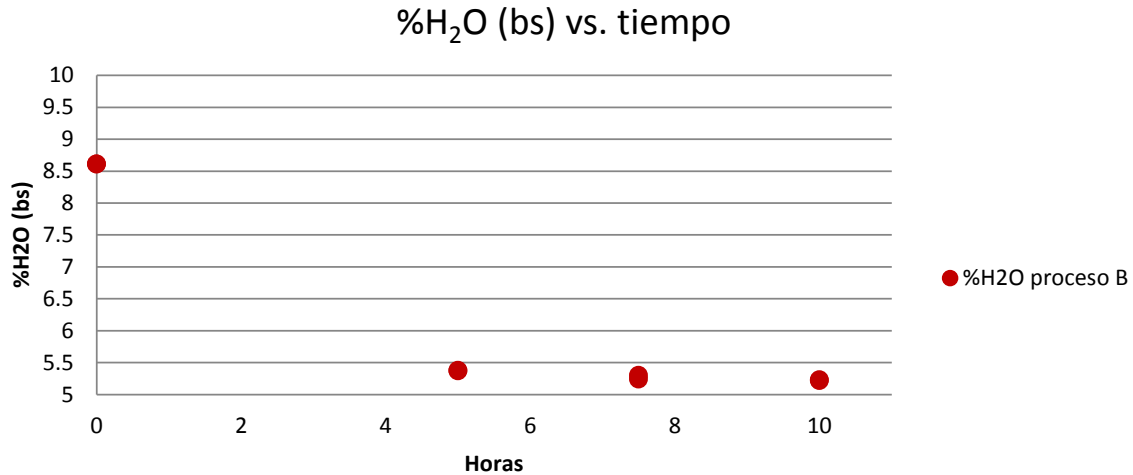


Figura 14. Porcentaje de agua expresado en base seca versus tiempo en horas. Proceso: secado en estufa a temperatura constante a 40°C durante 10 horas.

Como se aprecia en las figuras 8 y 9, el contenido de agua en el equilibrio (%H₂O bs (teq.)) es mayor cuando se parte de un %H₂O inicial (%H₂O bs (t₀)) mayor que cuando se parte de uno menor. En el proceso A se parte de un %H₂O bs (t₀)=9,5 y se llega a %H₂O bs (teq.)= 6,5; mientras que en el proceso B se parte de un %H₂O bs (t₀)=8,5 y se llega a %H₂O bs (teq.)= 5,5. Se define entonces una relación de humedades (MR, por sus siglas en inglés) que permite independizar los resultados del contenido de agua inicial de las semillas (16). (Sogi y col., 2003).

$$MR = \frac{\%H_2O \text{ bs } (t) - \%H_2O \text{ bs } (t \text{ eq.})}{\%H_2O \text{ bs } (t_0) - \%H_2O \text{ bs } (t \text{ eq.})} \quad (16)$$

Una vez calculados los valores de MR para cada %H₂O, se buscó un modelo de ecuación que ajuste los datos obtenidos según bibliografía en la que se propone el modelo de Page (17), ampliamente utilizado para describir el comportamiento de variedad de materiales biológicos con buenos resultados (Sogi y col.,2003).

$$MR = \exp^{-(k * tiempo^n)} \quad (17)$$

Donde k es la constante de la tasa de secado en horas^{-1} , y n es un exponente adimensional.

Luego se estimaron los parámetros k y n utilizando el programa Infostat para los datos de cada experimento por separado. A continuación se observan los valores de MR obtenidos experimentalmente y los predichos con el modelo de ajuste, en función del tiempo (Figuras 15 y 16).

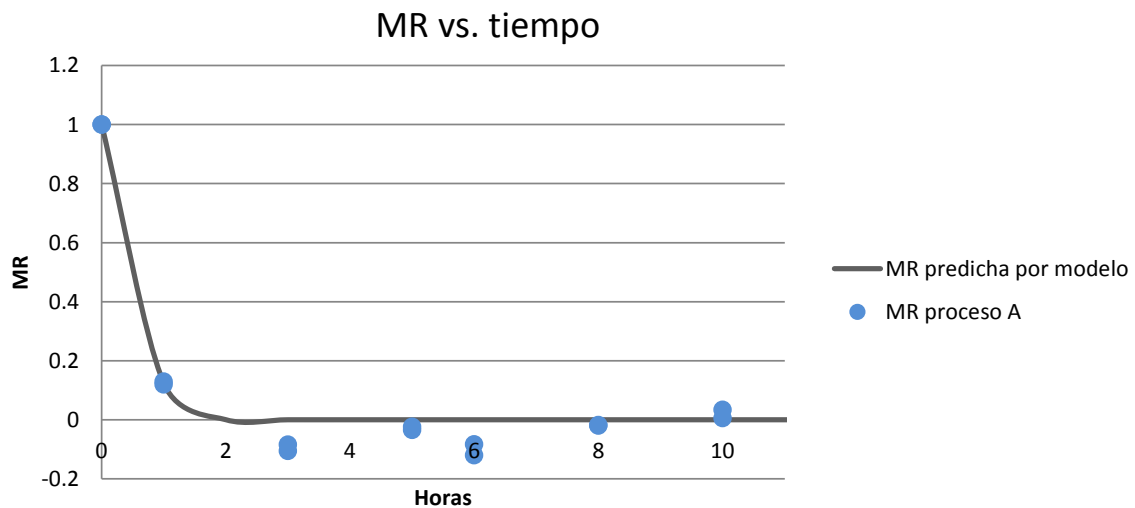


Figura 15. Relación de humedades expresada en base seca vs. tiempo en horas; y modelo de ajuste encontrado para los datos. Proceso: secado en estufa a 35° hasta $t=5$ h y luego a 40°C hasta las 10 horas de secado.

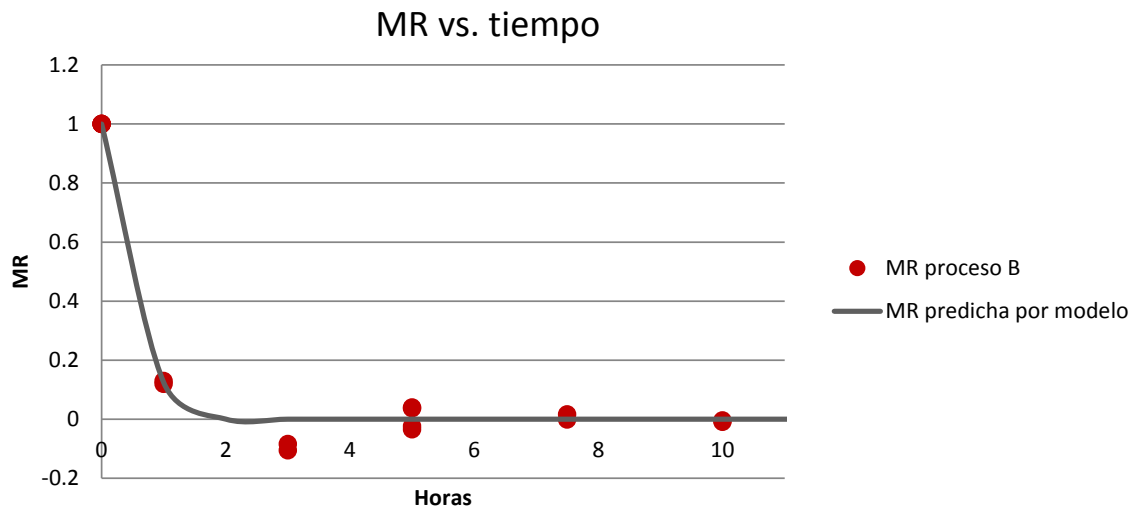


Figura 16. Relación de humedades vs. tiempo en horas; y modelo de ajuste encontrado para los datos. Proceso: secado en estufa a temperatura constante a 40°C.

Dado que los valores encontrados para k y n en los procesos A y B fueron $k=2,09$ y $n=2,00$ se considera que la ecuación de ajuste (18) es idéntica en ambos casos. Esto permitió unificar los datos de MR de los experimentos A y B en un único gráfico (figura 17), llegando a la conclusión que el secado en estufa realizado bajo las condiciones de temperatura del experimento A no presenta diferencias significativas respecto al secado realizado bajo las condiciones de temperatura de B.

$$MR = \exp^{-(2,09 * tiempo^{2,00})} \quad (18)$$

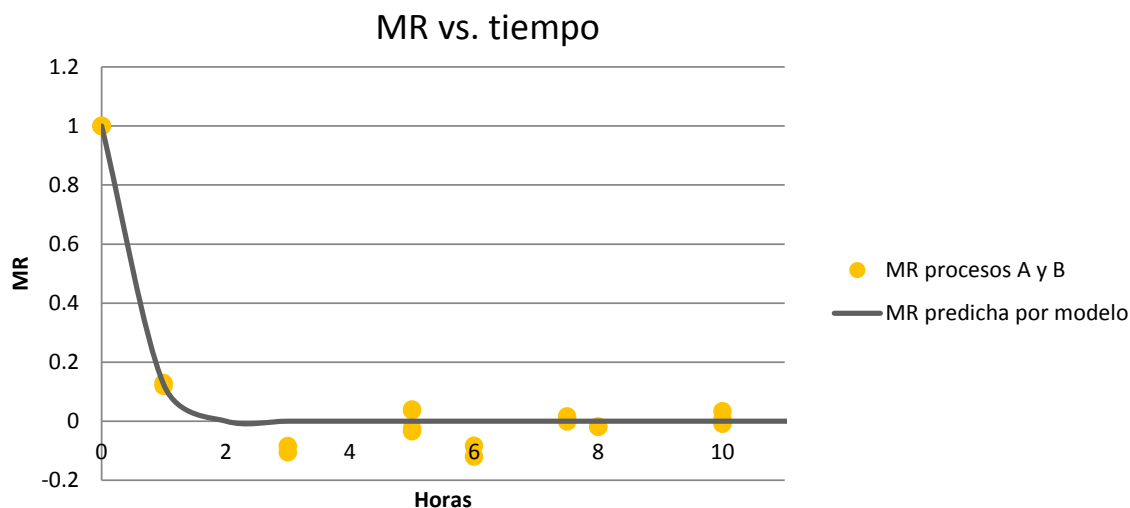


Figura 17. Relación de humedades versus tiempo en horas; y modelo de ajuste encontrado para los datos. Procesos unificados: a) secado en estufa a 35° hasta $t = 5h$ y luego a 40°C hasta las 10 horas de secado; b) secado en estufa a temperatura constante a 40°C.

En los gráficos de **MR vs tiempo** (Figuras 15, 16 y 17) se observa, de acuerdo a lo esperado, el mismo comportamiento descrito para el caso de $\%H_2O$ vs t , con la diferencia del punto de partida.

Mediante un análisis estadístico ANAVA, se observó que existe una buena correlación entre MR y el tiempo y se verificó que no hay falta de ajuste por lo que el modelo propuesto es correcto, como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Ensayo de falta de ajuste para los datos del secado en estufa.

FUENTE DE VARIACION	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calc.	Fcrit (5%)
SREG	1.7852	1.0000	1.7852	277.36	4.8400
FA	0.0470	6.0000	0.0078	1.22	3.0900
Se	0.0708	11.0000	0.0064		
ST	1.9030	18.0000			

Cuando se grafica **aw vs tiempo** (Figuras 18 y 19), en ambos casos se observa un salto desde el aw inicial a valores que se distribuyen alrededor de un aw constante en el tiempo.

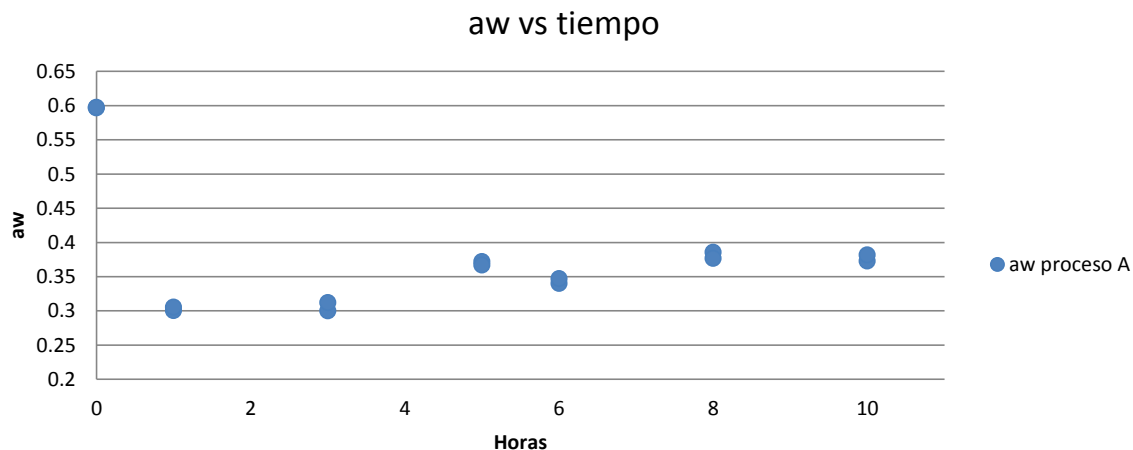


Figura 18. Actividad acuosa vs. tiempo en horas. Proceso: secado en estufa a 35° hasta $t=5$ h y luego a 40°C hasta las 10 horas de secado.

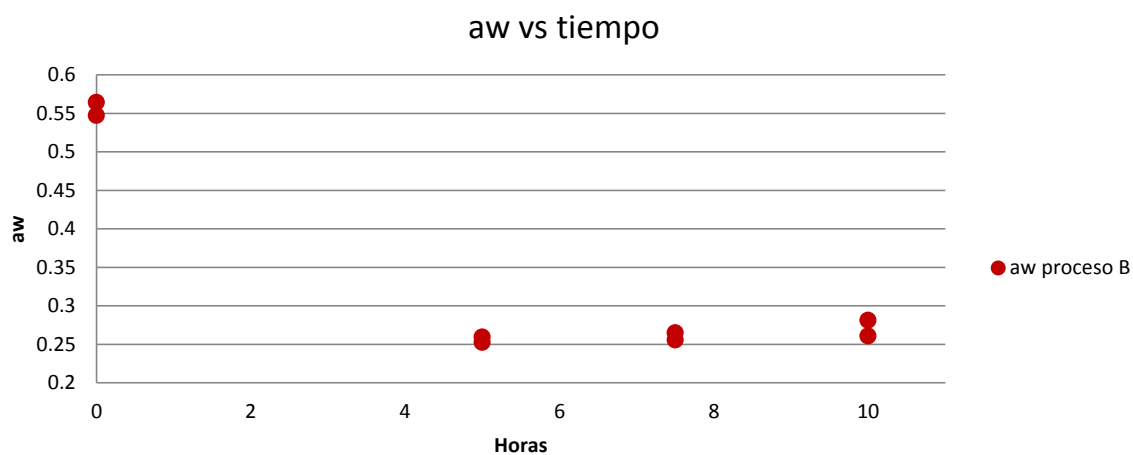


Figura 19. Actividad acuosa vs. tiempo en horas. Proceso: secado en estufa a temperatura constante a 40°C.

Por otro lado se verificó la **relación entre a_w y %H₂O (bs)** para ambos procesos, como se observa en las figuras 20 y 21. Los valores se hallan distribuidos alrededor de dos puntos fijos en el gráfico de a_w vs. %H₂O (bs). A mayores valores de a_w se observan mayores valores de %H₂O y viceversa.

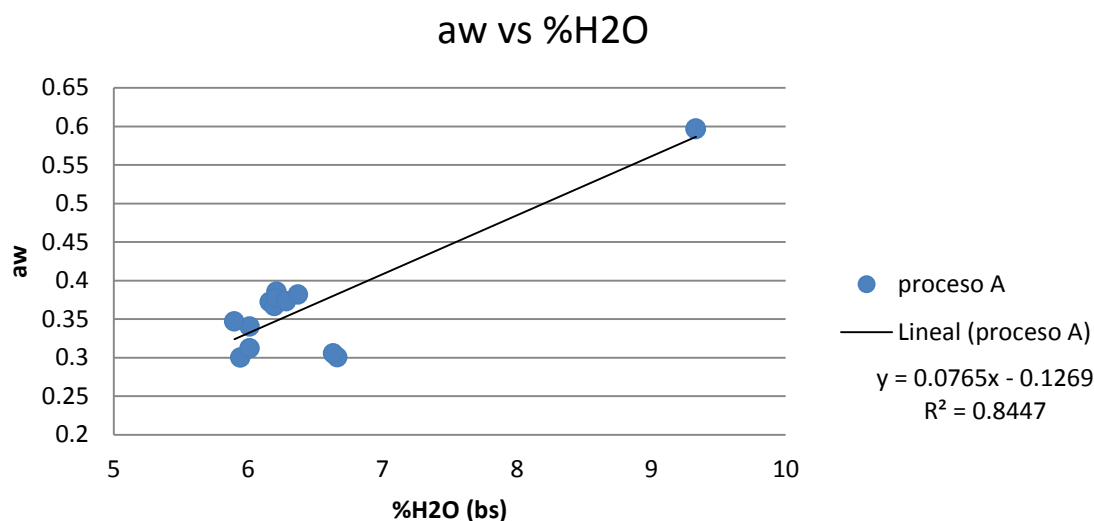


Figura 20. Correlación entre actividad acuosa y porcentaje de agua expresado en base seca.

Proceso: secado en estufa a 35° hasta $t = 5h$ y luego a 40°C hasta las 10 horas de secado.

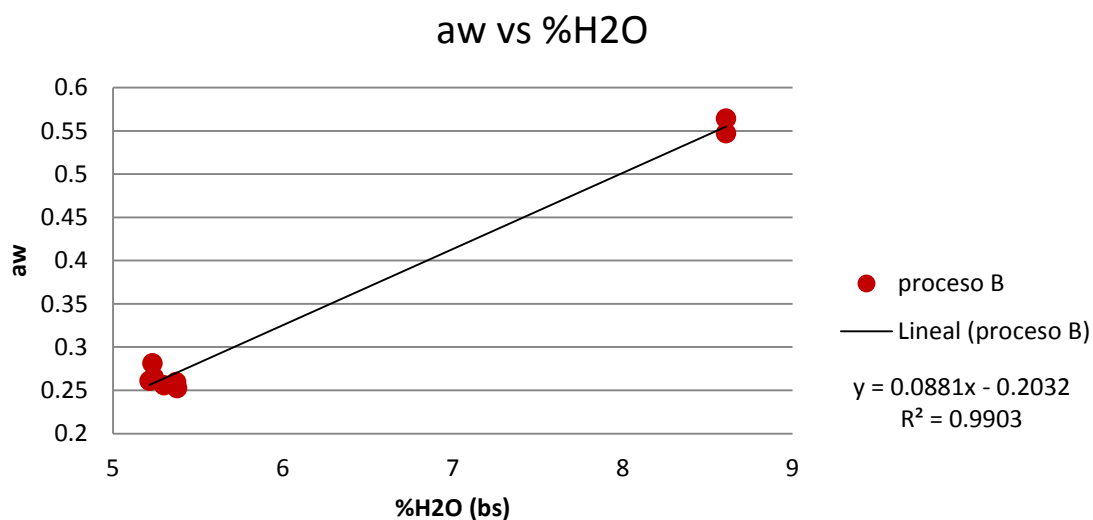


Figura 21. Correlación entre actividad acuosa y porcentaje de agua expresado en base seca. Proceso: secado en estufa a temperatura constante a 40°C.

Teniendo en cuenta que hay relación entre las variables, se podría predecir el contenido de humedad mediante la medición de a_w . Sin embargo, sería necesario contar con los valores de $\%H_2O$ (bs) y a_w comprendidos en el intervalo entre las dos zonas de puntos observadas en las figuras 20 y 21 para poder proponer un modelo para el ajuste de los datos. Por lo tanto, se plantea la necesidad a futuro de obtener la función de correlación de dichos parámetros según isoterma de desorción clásica (Ballesteros y walters 2007).

SECADO CON SALES

A partir de dos experimentos realizados acorde al protocolo “secado con sales” se obtuvieron los datos de porcentaje de humedad en base seca (%H₂O (bs)), relación de humedades (HR), y actividad acuosa (aw) ordenados en las diferentes graficas que se describen a continuación para el secado bajo dos condiciones distintas, a partir de atmósferas secas en equilibrio con sales de cloruro de litio (LiCl) y de cloruro de cinc (ZnCl₂) en cada caso, cada una con una HR definida detallada en tabla 6.

Tabla 6. Humedades relativas (HR) de la atmósfera en equilibrio con solución saturada determinada a 25°C para cloruro de litio y cloruro de cinc (Fuente: Vertucci y Ross, 1993).

Solución saturada de sal	Humedad relativa (HR)
LiCl	13
ZnCl ₂	5,5

Los experimentos, secado con LiCl y secado con ZnCl₂, fueron realizados a partir de dos lotes de semillas de tomate var. Chadwick que diferían solamente en su contenido de humedad. El lote 1 que poseía 7.99 % H₂O (bs) de humedad inicial, y un lote B que poseía 9.33 %H₂O (bs) de humedad inicial.

Cuando se grafica **%H₂O vs tiempo**, en todos los casos (Figuras 22, 23, 24 y 25) se observa un descenso del %H₂O a medida que se avanza en el tiempo. A tiempos cortos el descenso de %H₂O es más rápido y luego decrece hasta alcanzar un valor constante, considerado como el contenido de agua de la semilla en el equilibrio.

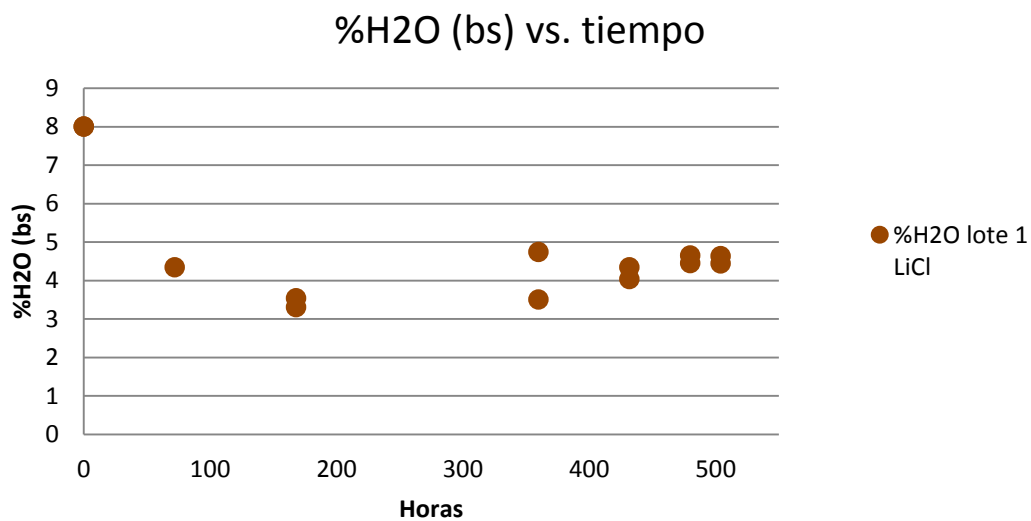


Figura 22. Porcentaje de agua expresado en base seca versus tiempo en horas. Proceso: secado con LiCl a temperatura constante. Lote 1.

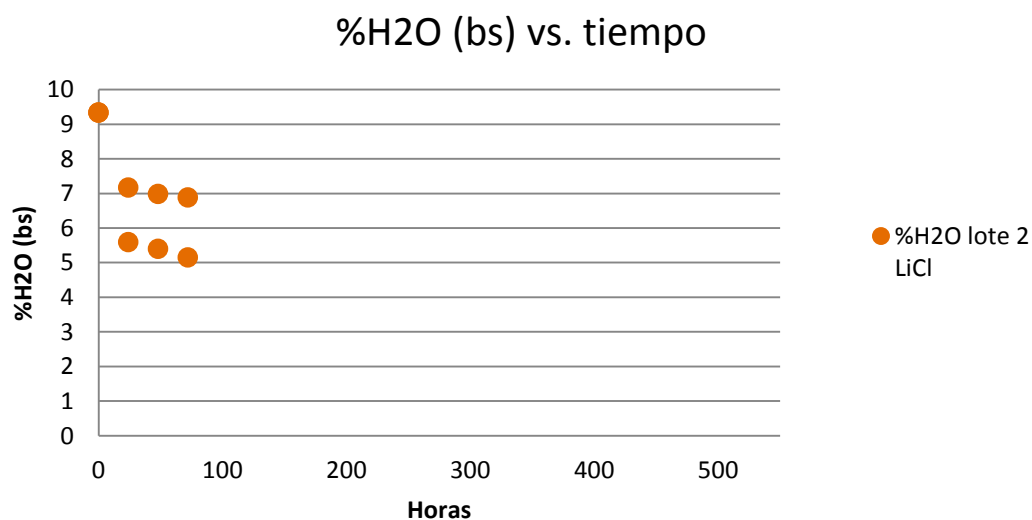


Figura 23. Porcentaje de agua expresado en base seca versus tiempo en horas. Proceso: secado con LiCl a temperatura constante. Lote 2.

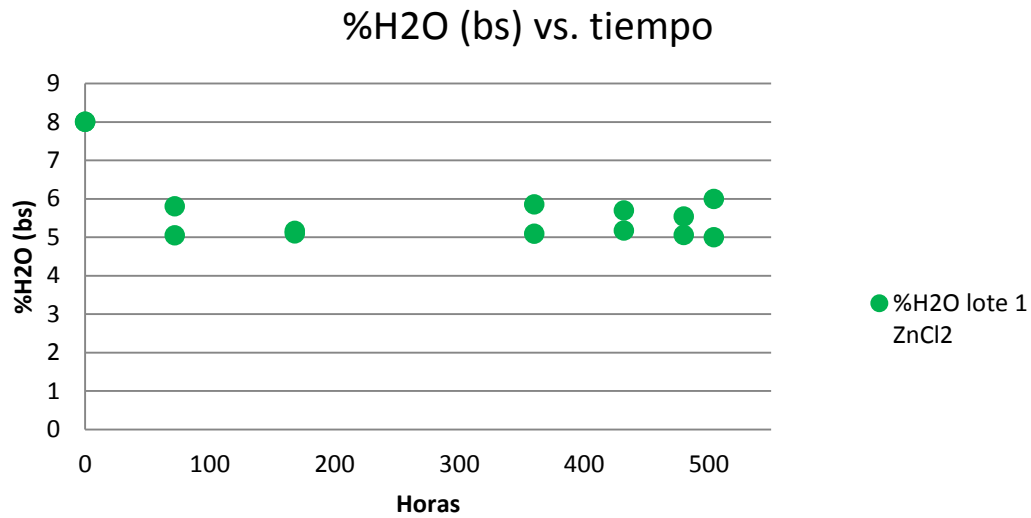


Figura 24. Porcentaje de agua expresado en base seca versus tiempo en horas. Proceso: secado con ZnCl_2 a temperatura constante. Lote 1.

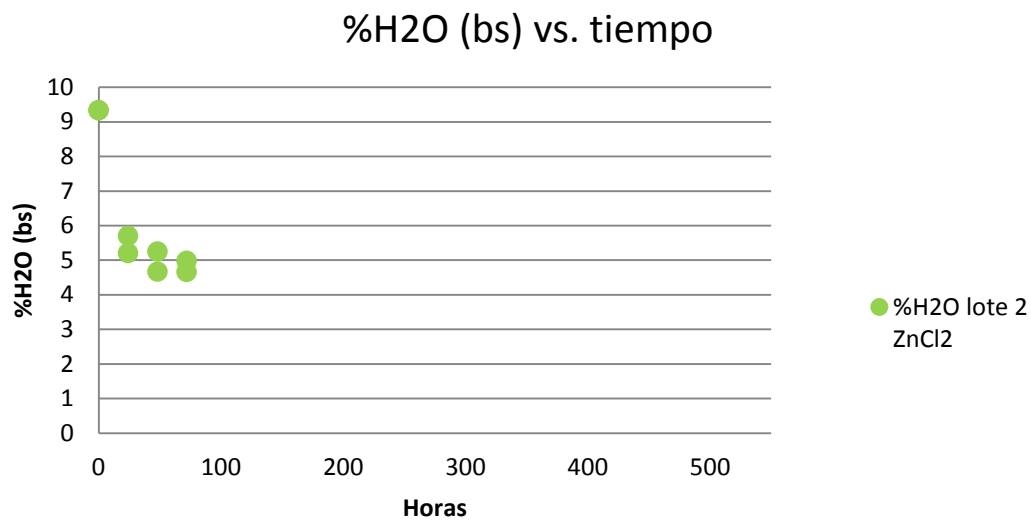


Figura 25. Porcentaje de agua expresado en base seca versus tiempo en horas. Proceso: secado con ZnCl_2 a temperatura constante. Lote 2.

Como las humedades de partida de cada lote son distintas, se define una relación de humedades (MR, por sus siglas en inglés) que permite independizar los resultados del contenido de agua inicial de las semillas (19) (Sogi y col., 2003).

$$MR = \frac{\%H_2O \text{ bs } (t) - \%H_2O \text{ bs } (t \text{ eq.})}{\%H_2O \text{ bs } (t_0) - \%H_2O \text{ bs } (t \text{ eq.})} \quad (19)$$

Una vez calculados los valores de MR para cada $\%H_2O$, se buscó un modelo de ecuación que ajuste los datos obtenidos según bibliografía en la que se propone el modelo de Page (20), ampliamente utilizado para describir el comportamiento de diversos materiales biológicos con buenos resultados (Sogi y col., 2003).

$$MR = \exp^{-(k * \text{tiempo}^n)} \quad (20)$$

Donde k es la constante de la tasa de secado en horas^{-1} , y n es un exponente adimensional.

Luego se estimaron los parámetros k y n utilizando el programa Infostat para las curvas de secado con $ZnCl_2$ y $LiCl$. A continuación se observan los valores de MR obtenidos experimentalmente y los predichos con el modelo de ajuste, en función del tiempo (Figuras 26 y 27).

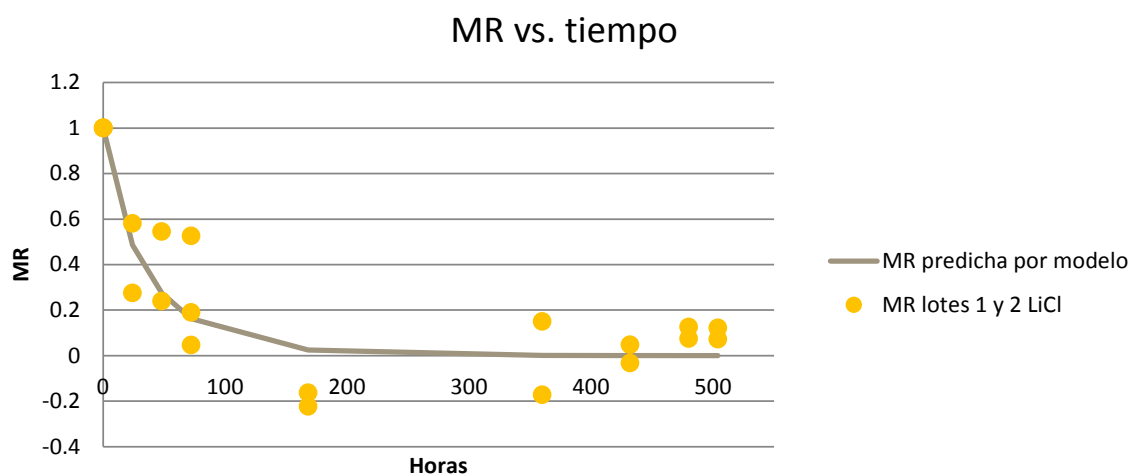


Figura 26. Relación de humedades vs. tiempo en horas; y modelo de ajuste encontrado para los datos. Proceso: secado con $LiCl$ a temperatura constante. Lotes 1 y 2.

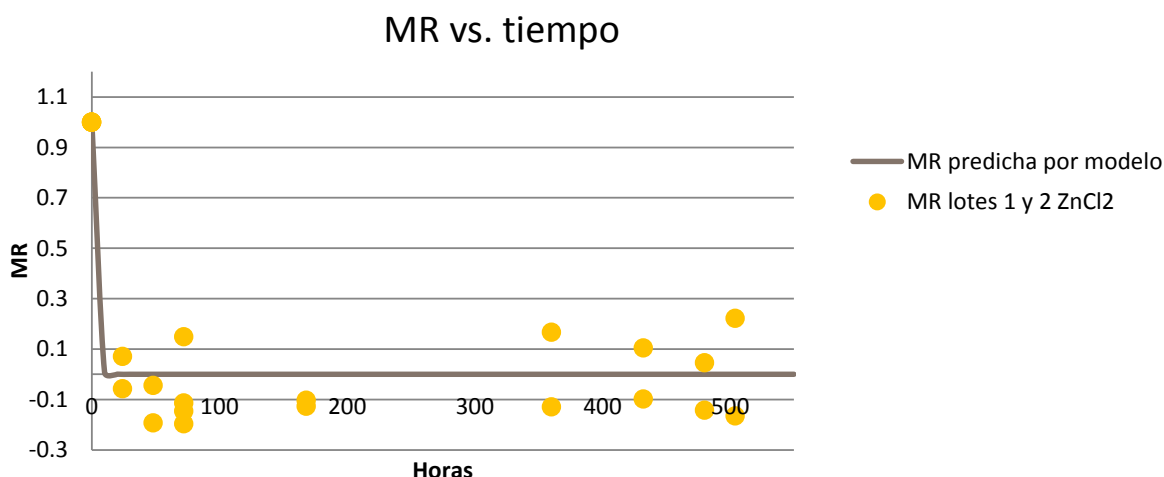


Figura 27. Relación de humedades expresada en base seca vs. tiempo en horas; y modelo de ajuste encontrado para los datos. Proceso: secado con ZnCl_2 a temperatura constante. Lotes 1 y 2.

Dado que las condiciones de ensayo fueron idénticas durante el tratamiento de los lotes para cada sal y que MR permite independencia de los porcentajes iniciales de humedad, se determinaron los valores para k y n a partir de los datos de los lotes 1 y 2 integrados en cada caso. Se encontró una ecuación de ajuste para el secado con LiCl (21), y otra distinta para la curva de secado con ZnCl_2 (22):

$$\text{MR} = \exp^{-(0,05 * \text{tiempo}^{0,86})} \quad (21)$$

$$\text{MR} = \exp^{-(1,19 * \text{tiempo}^{0,62})} \quad (22)$$

En los gráficos de **MR vs tiempo** (Figuras 26 y 27) se observa, de acuerdo a lo esperado, el mismo comportamiento descrito para el caso de $\%\text{H}_2\text{O}$ vs t , con la diferencia del punto de partida.

Mediante un análisis estadístico ANAVA, se observó que existe una buena correlación entre MR y el tiempo y se verificó que no hay falta de ajuste por lo que el modelo propuesto es correcto, como se observa en tablas 7 y 8.

Tabla 7. Ensayo de falta de ajuste para los datos del secado con LiCl.

FUENTE DE VARIACION	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calc.	Fcrit (5%)
SREG	2.9820	1.0000	2.9820	214.18	4.8400
FA	0.1687	8.0000	0.0211	1.51	3.0900
Se	0.1531	11.0000	0.0139		
ST	3.3038	20.0000			

Tabla 8. Ensayo de falta de ajuste para los datos del secado con ZnCl₂.

FUENTE DE VARIACION	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calc.	Fcrit (5%)
SREG	3.299	1.0000	3.2991	98.81	4.8400
FA	0.1573	8.0000	0.0197	0.59	3.0900
Se	0.4007	12.0000	0.0334		
ST	3.8571	21.0000			

Cuando se grafica **aw vs. tiempo** (Figuras 28, 29, 30 y 31), en todos los casos se observa un salto desde el aw inicial a valores que se distribuyen alrededor de un aw menor constante en el tiempo.

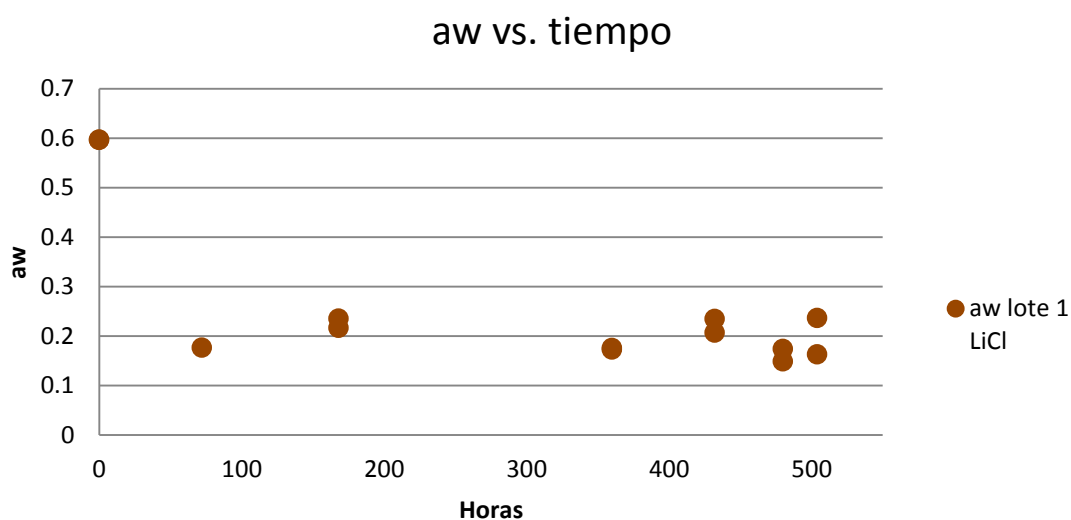


Figura 28. Actividad acuosa vs. tiempo en horas. Proceso: secado con LiCl a temperatura constante. Lote 1.

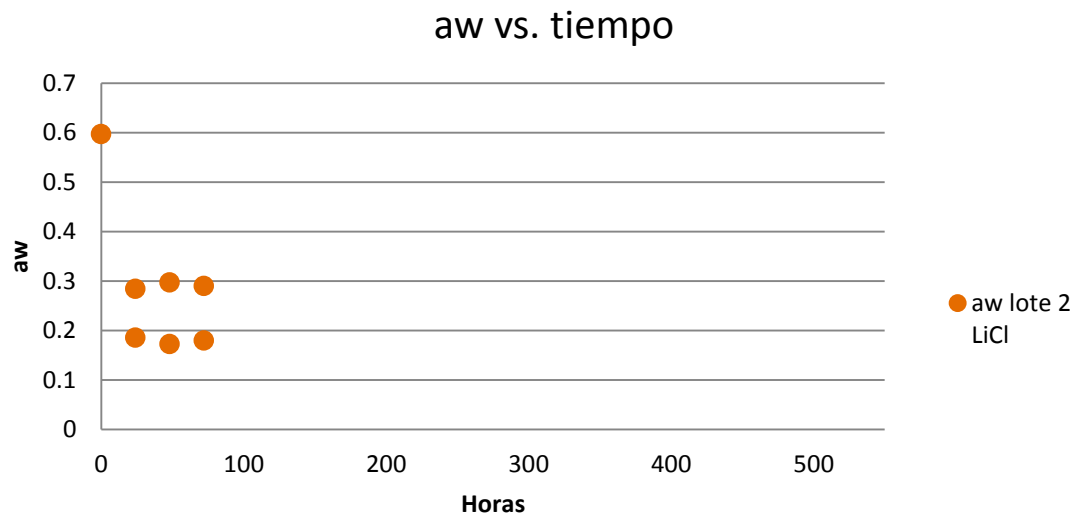


Figura 29. Actividad acuosa vs. tiempo en horas. Proceso: secado con LiCl a temperatura constante. Lote 2

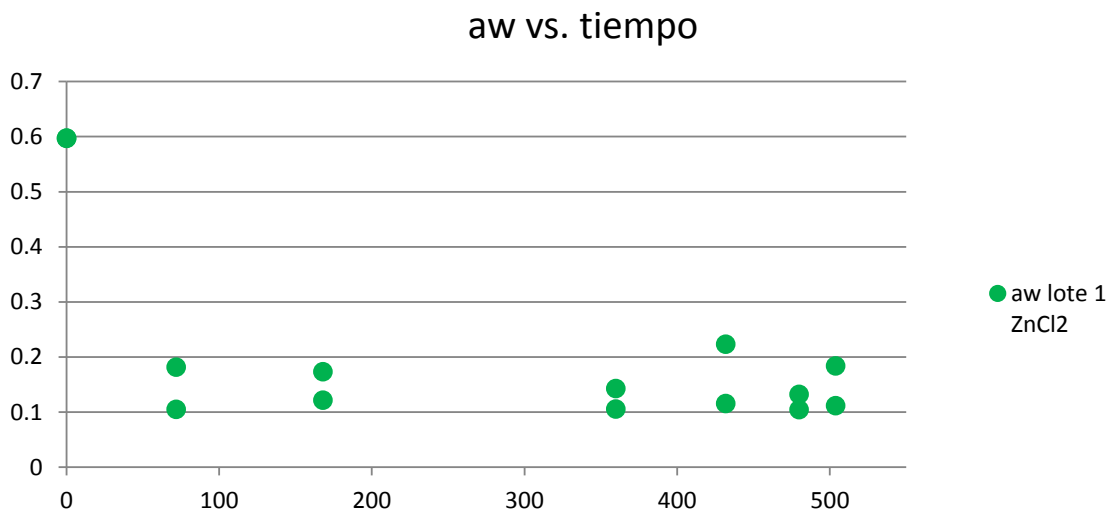


Figura 30. Actividad acuosa vs. tiempo en horas. Proceso: secado con ZnCl₂ a temperatura constante. Lote 1.

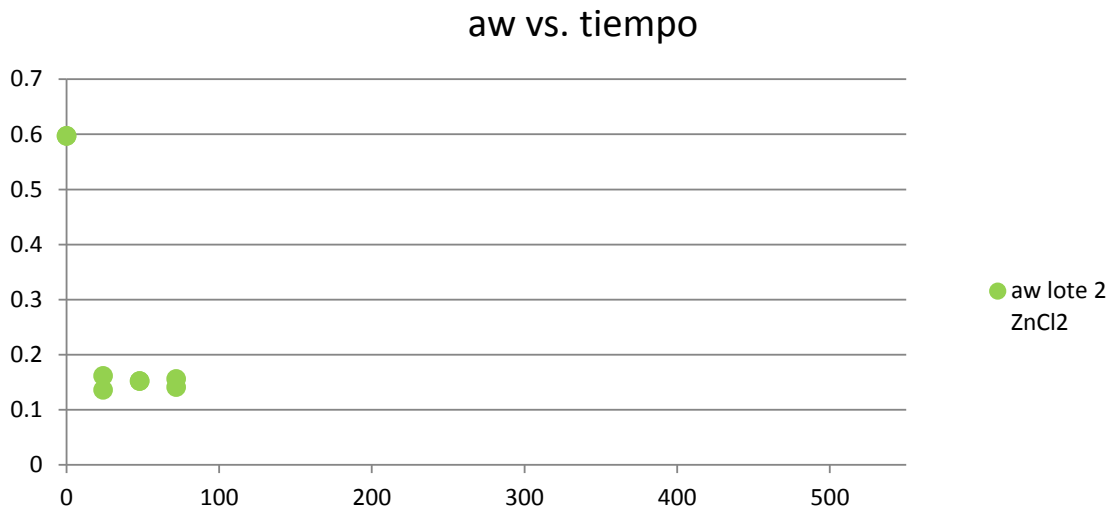


Figura 31. Actividad acuosa vs. tiempo en horas. Proceso: secado con ZnCl₂ a temperatura constante. Lote 2.

Por otro lado se verificó la relación entre aw y %H₂O (bs) en ambos procesos para el lote 1 de semillas (figuras 32 y 33), donde se observaron valores distribuidos alrededor de dos puntos fijos en el gráfico de aw vs. %H₂O (bs). A mayores valores de aw se observaron mayores valores de %H₂O y viceversa.

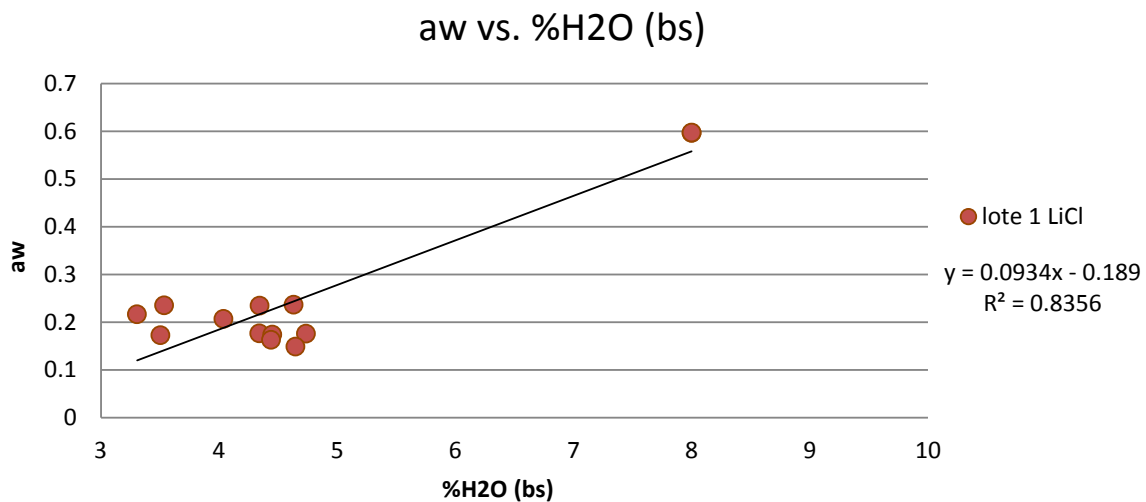


Figura 32. Correlación entre actividad acuosa y porcentaje de agua expresado en base seca. Proceso: secado con LiCl a temperatura constante. Lote 1.

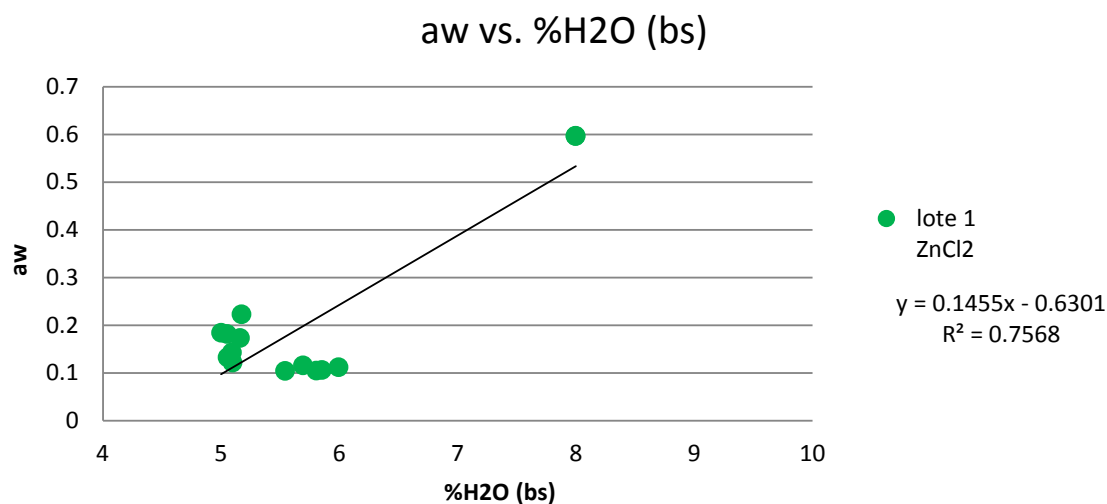


Figura 33. Correlación entre actividad acuosa y porcentaje de agua expresado en base seca.
Proceso: secado con ZnCl₂ a temperatura constante. Lote 1.

Teniendo en cuenta que hay relación entre las variables, se podría predecir el contenido de humedad mediante la medición de aw. Sin embargo, sería necesario contar con los valores de %H₂O (bs) y aw comprendidos en el intervalo entre las dos zonas de puntos observadas en las figuras 32 y 33 para poder proponer un modelo para el ajuste de los datos. Por lo tanto, se plantea la necesidad a futuro de obtener la función de correlación de dichos parámetros según isoterma de desorción clásica (Ballesteros y Walters 2007).

VIABILIDAD

Los experimentos fueron realizados a partir de un lote de semillas de tomate var. Chadwick para control de viabilidad de las mismas luego de cuatro procesamientos diferentes, cada uno compuesto por un método de secado y un tiempo de almacenamiento determinados, tal como se describe en tabla 9.

Tabla 9. Detalle de los diferentes procesamientos aplicados a las muestras de semillas a las que se les evaluó PG y vigor.

Muestra	Procesamiento	
	Método de secado	Tiempo de almacenamiento a 4°C
i.	Ninguno	Ninguno
ii.	LiCl/ 1 semana	2 meses
iii.	ZnCl ₂ / 1 semana	2 meses
iv.	Estufa 40°C/ 10 horas	3 meses
v.	LiCl/ 20 días	3 meses
vi.	ZnCl ₂ / 20 días	3 meses

Acorde al protocolo “Poder germinativo y vigor” se obtuvieron los datos de poder germinativo (PG), y vigor organizados en la figura 34 para cada lote.

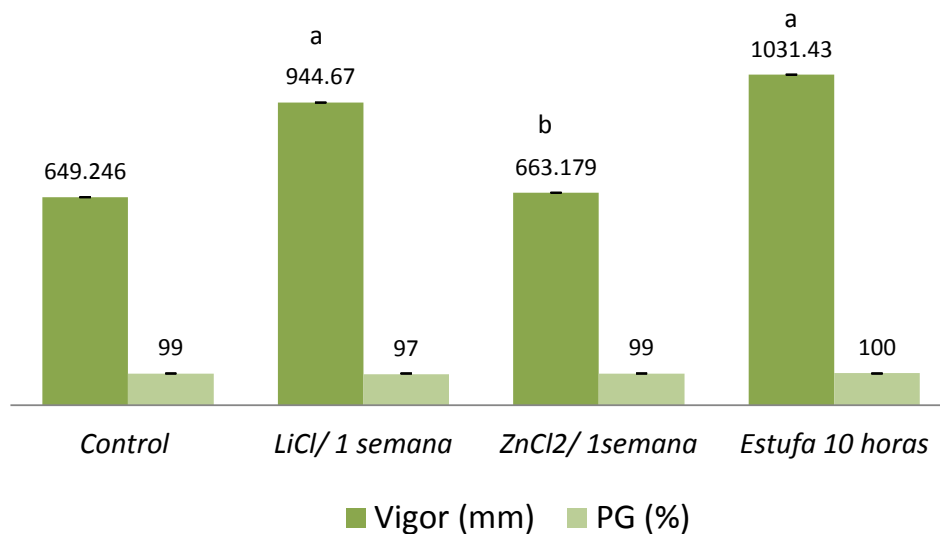


Figura 34. Resultados de PG y vigor para cada muestra de semillas: i) Control: ningún tratamiento; ii) secado por LiCl/1 semana y 2 meses de almacenamiento; iii) secado por ZnCl/ 1 semana y 2 meses de almacenamiento; iv) secado por estufa 40°C/ 10 horas y 3 meses de almacenamiento.
*Letras iguales indican valores sin diferencias significativas (Test de LSD, $\alpha=0.05$, $n=90$).

A partir de los datos se concluye que PG se mantiene por encima del 97% en todos los casos, sin diferencias entre tratamientos. Este resultado es el óptimo, ya que según normas ISTA la semilla debe tener al menos un 85% de poder germinativo para que la conservación tenga sentido.

Para el análisis estadístico de los datos de vigor, solo se tuvieron en cuenta los tratamientos de secado (ii, iii, y iv) para los cuales el largo de raíz se midió a las 96 horas. Los datos de control no fueron tenidos en cuenta ya que a este tiempo las plántulas mostraban cotiledón (se pasó el tiempo de medida de vigor: la medida del largo de las raíces debe realizarse una vez que la mayoría de las semillas hayan germinado y antes de la aparición del cotiledón). El secado con cloruro de cinc mostró una disminución significativa del vigor en relación al secado en estufa y con cloruro de litio (Figura 34).

La figura 35 muestra los resultados obtenidos a en el test de PG y vigor para los diferentes procesamientos de semillas (ii, iii, y iv).

Por otro lado, siguiendo el protocolo de “Test de tertrazolio”, se evaluaron cualitativamente las muestras de semillas de los tratamientos i-iv. En todos los casos se

observó un cambio de coloración de blanca a roja de los embriones de las semillas (Figura 35), indicando la viabilidad de las mismas. En contraste, se analizó un lote de semillas muertas por calor seco en estufa 130 °C/ 1 hora de acuerdo al protocolo de “Determinación de sólidos totales”, donde los embriones permanecieron blancos, indicando la no viabilidad de las mismas (Figura 36).

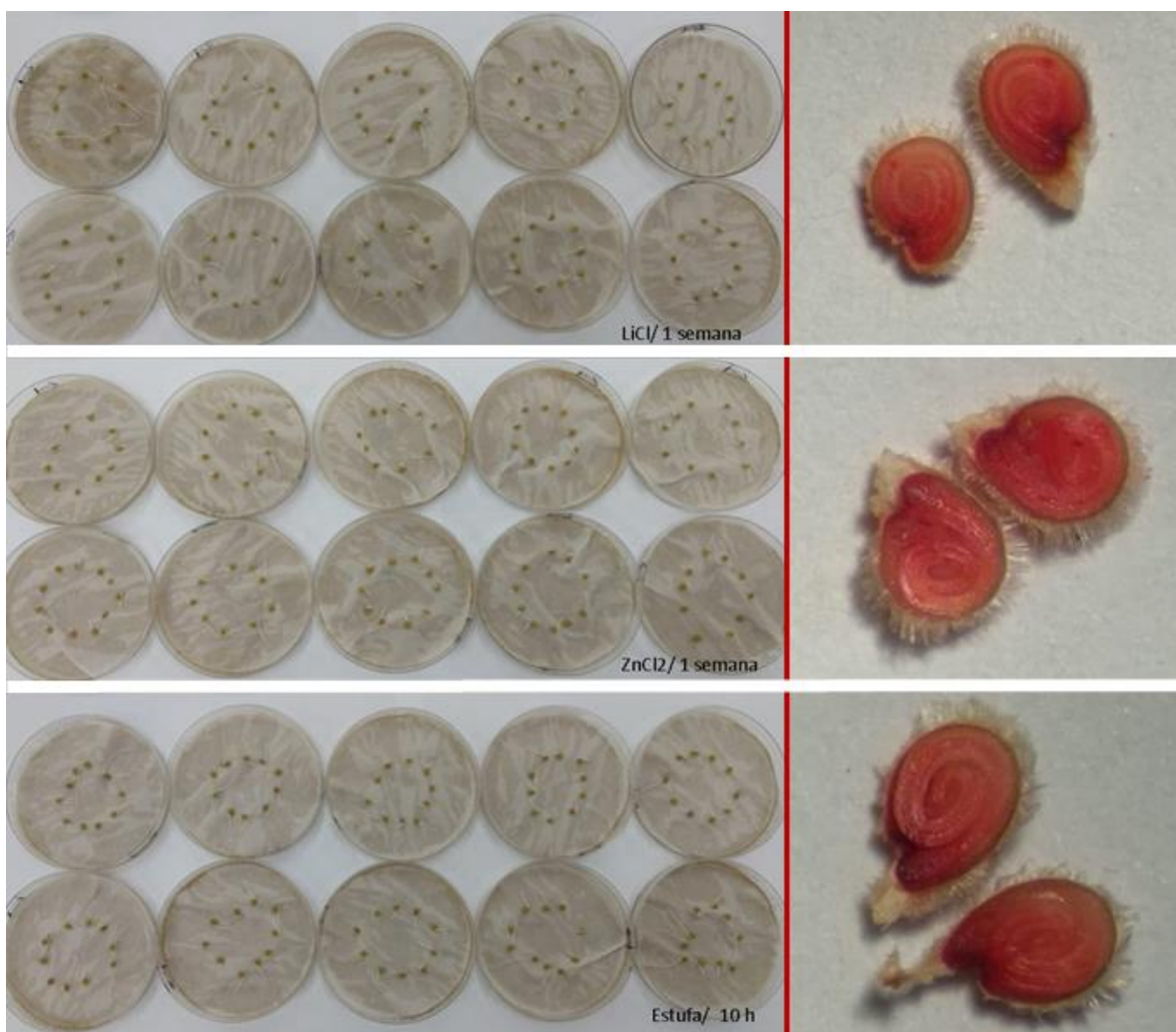


Figura 35. (a): Test de PG y vigor a las 96 horas de ensayo, para los diferentes procesamientos las semillas: ii) secado por LiCl/1 semana y 2 meses de almacenamiento; iii) secado por ZnCl₂/ 1 semana y 2 meses de almacenamiento; y iv) secado por estufa 40°C/ 10 horas y 3 meses de almacenamiento. (b): Resultado del test de tetrazolio positivos para los procesamientos ii-iv.



Figura 36. Resultado del test de tetrazolio negativo: semilla muerta por calor.

CONCLUSIONES

Las cinéticas de secado de las semillas de tomate, evaluadas por tres métodos diferentes, se pueden describir mediante las ecuaciones que se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros n y k que describen las ecuaciones de ajuste para MR en el tiempo para cada método de secado.

Método de secado	N	k	Ecuación de ajuste para MR
Secado en Estufa	2,00	2,09	$MR = \exp^{-(2,09 * tiempo^{2,00})}$
Secado con LiCl	0,86	0,05	$MR = \exp^{-(0,05 * tiempo^{0,86})}$
Secado con ZnCl ₂	0,62	1,19	$MR = \exp^{-(1,19 * tiempo^{0,62})}$

Las ecuaciones determinadas en este trabajo son de gran utilidad para el BdG ya que a partir de estas se puede estimar un tiempo de secado ($t = \sqrt[n]{\frac{\ln(MR)}{-k}}$) que permitirá optimizar el proceso en términos de ahorro de tiempo y energía, sin que las semillas pierdan su calidad fisiológica (poder de germinación y vigor). Se observó que el contenido inicial de humedad de las semillas es determinante para el tiempo total del proceso de secado.

Se plantea a futuro obtener una ecuación que permita relacionar el contenido de humedad de las semillas y su valor de aw correspondiente. Esta relación optimizará las actividades operativas del BdG sin la pérdida de material fitogenético, ya que la medición de aw es más sencilla comparada con la del contenido de humedad y no destructiva.

AGRADECIMIENTOS

Tomo esta página como mi oportunidad de homenajear a todas las personas que me ayudaron a concretar este proyecto.

A mi familia, por el apoyo a mi formación.

A la Universidad Nacional de La Plata, en agradecimiento a una educación pública, libre, gratuita y de calidad. Espero retribuir de alguna manera a todo lo que me brindó, la celebro y reafirmo la necesidad de defender este derecho en los tiempos que corren.

Más específicamente quiero agradecer a Lore por acompañarme en todo el recorrido, por haber superado mis expectativas de trabajo en el CIDCA, por la libertad y confianza que me dio, por el criterio, su paciencia infinita y los gajitos de manzana.

Al Rulo, por enseñarme a buscarle un sentido a la ciencia, y a cuestionar permanentemente los roles que ocupamos... me interpela como extensionista, como estudiante y como proyecto de científica. Un pedacito de todos estos años de haberlo tenido como compañero se materializan en este manual.

A Aline, por su incondicionalidad, por estar presente en cada detalle y acompañarme en las largas jornadas de trabajo. Me hizo sentir parte del laboratorio desde un principio.

A Mc Arthy, por saber ofrecerme siempre un cambio de perspectiva a las situaciones que le planteo, este trabajo no fue la excepción.

A Juan, por las matemáticas.

A Ariel, por la revisión de conceptos fisicoquímicos abordados en este manual y por la motivación en actividades que decido encarar.

A mis compañeras y compañeros del BdG, por las visitas a quintas, los debates, las tardes de mate y todas esas cosas que me motivan a escribir este manual como integrante del banco de germoplasma.

A Gonza y More, grandes amigos que aportaron con sinceridad y constructivismo a los textos que fui escribiendo.

A Juana y su familia, por sembrar en el patio de su casa las semillas de tomate var. Chadwick utilizadas en los ensayos realizados durante este proyecto.

A Viqui, por el diseño de tapa y contratapa, hermosas ilustraciones.

Citas bibliográficas:

- Argerich, C. A., y Gaviola, J. C. (1995). Manual de producción de semillas hortícolas. Tomate. [En línea]. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina
- Ballesteros, D., y Walters, C. (2007). Water properties in fern spores: sorption characteristics relating to water affinity, glassy states, and storage stability. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1185-1196
- Calderón Piñar (2009). Evaluación de alternativas de secado y conservación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), calabaza (*Cucurbita moschata* Duch.) y maíz (*Zea mays* L.) para condiciones de Agricultura Urbana. INIFAT. La Habana, Cuba.
- Chin HF. (1994) Seed bank-conserving the past for the future. Bancos de Germoplasma (Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8). Bioversity International.
- Engels, J., y Visser, L. (2007). *Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma- Manuales de Bioversity para Bancos de Germoplasma No. 6* (No. 6). Bioversity International.
- Fennema, O. R. (1993). Química de los alimentos (No. 664: 543). Acribia.
- Iglesias HA y Chirife J. (1982). Mathematical description of isotherms. In H. A. Iglesias y J. Chirife (Eds.), Handbook of food isotherms: Water sorption parameters for food and food components (pp. 262–264). New York: Academic Press.
- Iriondo JM, Perez C. (1999). Propagation from seeds and seed preservation. A colour atlas of plant propagation and conservation, 46-57.
- ISTA The International Seed Testing Association (2018). Zürichstr. 50, CH-8303 Bassersdorf, Switzerland.
- Kuehl, R. (2000). Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. *Thomson Learning. 2da ed. México y América Central, Mexico*.
- Moore RP. (1962) Tetrazolium as a universally acceptable quality test of viable seed. Proceedings of the International Seed Testing Association, 27: 795-805.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K. (2007). Manual para el Manejo de Semillas en un banco de germoplasma.
- Ruiz, M. A. (2009). El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. *Caso de estudio: cebadilla chaqueña. EEA INTA Anguil Argentina (77)*, 1-19.
- Sogi, D. S., Shivhare, U. S., Garg, S. K., y Bawa, A. S. (2003). Water sorption isotherm and drying characteristics of tomato seeds. *Biosystems Engineering*, 84(3), 297-301.
- Vertucci, C. W. (1992). A calorimetric study of the changes in lipids during seed storage under dry conditions. *Plant Physiology*, 99(1), 310-316.
- Vertucci, C. W.; Roos, E. E. (1993). Theoretical basis of protocols for seed storage II. The influence of temperature on optimal moisture levels. *Seed Science Research*, 3(3), 201-213